# Untersuchungen über die Wirkung von Pentachlorphenol, 2, 4, 5 - Trichlorphenol und Chlorferron auf die Linsentransparenz von Ratten

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
Bonn

vorgelegt von
**Matthias Boettel**
aus Neuhaus b. Trier

Bonn 1980

# Untersuchungen über die Wirkung von Pentachlorphenol, 2, 4, 5 - Trichlorphenol und Chlorferron auf die Linsentransparenz von Ratten

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
Bonn

vorgelegt von
**Matthias Boettel**
aus Neuhaus b. Trier

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Reinhard Koch

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Bergeder

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Klinischen Institut für experimentelle Ophthalmologie

der Universität Bonn

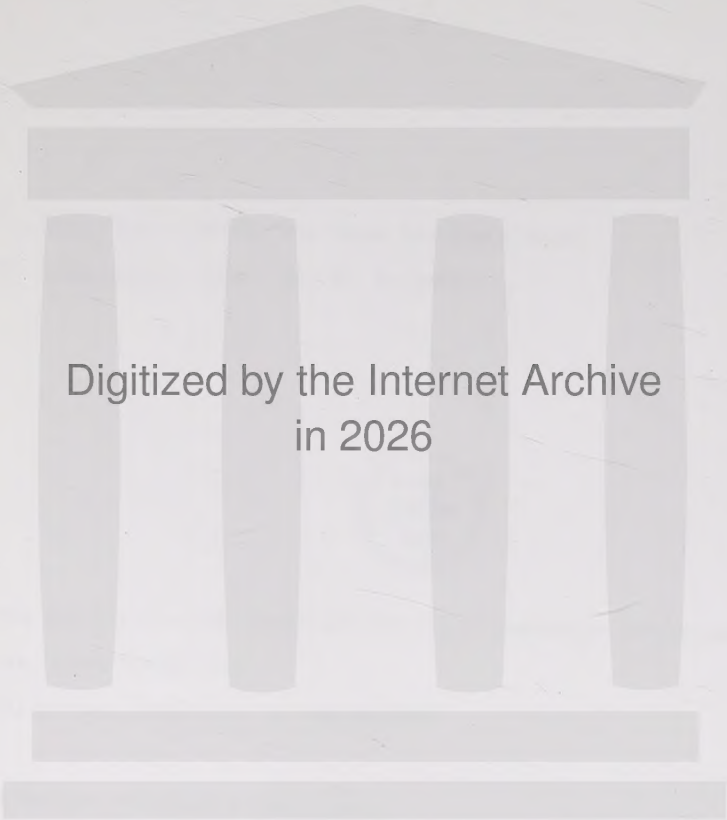
(Direktor: Prof. Dr. E. Weigelin)

Abteilung Biochemie des Auges

(Leiter: Prof. Dr. O. Hockwin)

Druck: Richard Schwarzbold, 5305 Witterschlick bei Bonn

In Dankbarkeit
meiner Mutter gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546508_0026

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1 | Problemstellung | 7 |
| 2 | Einführung | 8 |
| 2.1 | Die toxische Katarakt | 8 |
| 2.1.1 | Dinitrophenol, Dinitrokresol | 8 |
| 2.1.2 | Cholinesterasehemmer | 10 |
| 2.2 | Umweltchemikalien | 12 |
| 2.2.1 | Pentachlorphenol | 12 |
| 2.2.1.1 | Struktur, chemische und physikalische Eigenschaften | 12 |
| 2.2.1.2 | Synthese | 13 |
| 2.2.1.3 | Vorkommen | 15 |
| 2.2.1.4 | Stoffwechsel und Ausscheidung | 16 |
| 2.2.1.5 | Toxikologie | 19 |
| 2.2.1.5.1 | Allgemeine Erkrankungen | 19 |
| 2.2.1.5.2 | Erkrankungen am Auge | 22 |
| 2.2.1.6 | Tierversuche | 23 |
| 2.2.2 | 2,4,5 - Trichlorphenol | 26 |
| 2.2.2.1 | Struktur, chemische und physikalische Eigenschaften | 26 |
| 2.2.2.2 | Synthese | 27 |
| 2.2.2.3 | Verwendung und Vorkommen | 28 |
| 2.2.2.4 | Stoffwechsel und Ausscheidung | 29 |
| 2.2.2.5 | Toxikologie | 32 |
| 2.2.2.5.1 | Allgemeine Erkrankungen | 32 |
| 2.2.2.5.2 | Erkrankungen am Auge | 35 |
| 2.2.2.6 | Tierversuche | 36 |
| 2.2.3 | Chlorferron | 38 |

Seite

2.2.3.1 Struktur, chemische und physikalische Eigenschaften 38
2.2.3.2 Synthese 38
2.2.3.3 Verwendung und Vorkommen 38
2.2.3.4 Stoffwechsel und Ausscheidung 39
2.2.3.5 Toxikologie 40
2.2.3.5.1 Allgemeine Erkrankungen 40
2.2.3.5.2 Erkrankungen am Auge 40

2.3 Die Einwirkungen der Umweltchemikalien auf die Linse 41

3 Material und Methoden 46

3.1 Versuchstiere, Tierhaltung 46
3.2 Umweltchemikalien und Lösungsmittel 46
3.3 Herstellung der Augentropfen 47
3.4 Versuchsaufbau und Voruntersuchung 48
3.5 Versuchsdurchführung 49
3.5.1 Applikation der Augentropfen 49
3.5.2 Spaltlampenuntersuchung 49
3.5.3 Körpergewichte 50
3.5.4 Linsenpräparation 50
3.5.5 Homogenisieren und Extrahieren 51
3.5.6 Gaschromatographische Analyse 51
3.6 Auswertung der Meßdaten 51
3.6.1 Morphologische Befunde 51
3.6.2 Körpergewichte 52
3.6.3 Linsenfrischgewichte 56

4 Ergebnisse 57

4.1 Morphologische Befunde 57
4.1.1 Gruppe 0 (Kontrolle) 57
4.1.2 Gruppe 1 (Chlorferron) 58
4.1.3 Gruppe 2 (Trichlorphenol) 58
4.1.4 Gruppe 3 (Pentachlorphenol) 59
4.1.5 Gruppe 4 (Lösungsmittel) 59
4.2 Körpergewichte 62
4.3 Linsenfrischgewichte 66
4.4 Rückstandsanalyse 69

5 Diskussion 70

6 Zusammenfassung 75

7 Literatur 76

## 1 Problemstellung

Aus vielfältigen Gründen müssen heute immer mehr chemische Substanzen in Landwirtschaft und Industrie eingesetzt werden. Einige dieser Stoffe, insbesondere Pestizide vom Typ der Cholinesterasehemmer, verursachen Linsentrübungen bei Menschen und Tieren. Da es eine große Zahl von Substanzen gibt, deren Einfluß auf die Augenlinse noch nicht überprüft wurde, ist es wichtig, daß durch systematische Untersuchungen eine Risikoabschätzung für bestimmte Stoffgruppen vorgenommen wird.

In diesem Sinne sollte der Einfluß der drei Substanzen Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron auf die Entwicklung von Linsentrübungen untersucht werden. Es war bekannt, daß diese Umweltchemikalien in die Linse eindringen und dort einen Stoffwechselschaden setzen können. Es sollte daher in einem Langzeitversuch an Ratten überprüft werden, ob eine regelmäßig lokal in Tropfenform applizierte, subletale Dosis jener Substanzen eine toxische Katarakt auslösen kann.

# 2 Einführung

## 2.1 Die toxische Katarakt

Allgemein wird jede Eintrübung der Augenlinse als grauer Star oder Katarakt bezeichnet. Es gibt angeborene und erworbene Katarakte. Von den erworbenen Katarakten ist der Alterstar (Cataracta senilis) der häufigste.

Eine Katarakt kann auch durch physikalische Einwirkungen auf die Linse entstehen, z.B. Hitzestar, traumatische Katarakt, Röntgenstar.

Unter dem Begriff der "toxischen Katarakt" werden alle Linsentrübungen zusammengefaßt, die sich nach der Einwirkung von körperfremden chemischen Substanzen auf die Linse entwickeln. Dabei kommen auch verschiedene Medikamente in Betracht.

Die Zahl der bekannten chemischen Kataraktnoxen ist immens. Aus der Vielzahl solcher Substanzen sollen im folgenden nur zwei Gruppen herausgegriffen werden, die mit den drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen gemeinsame Eigenschaften aufweisen: die Entkoppler der Atmungskettenphosphorylierung und die Cholinesterasehemmer.

Es ist bekannt, daß Pentachlorphenol und 2,4,5-Trichlorphenol nach allen bisherigen Versuchsergebnissen ihre Wirkung im Gesamtorganismus als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung entfalten; Chlorferron dagegen besitzt die Eigenschaften einer Anticholinesterase.

### 2.1.1 Dinitrophenol, Dinitrokresol

Als Entkoppler der Atmungskettenphosphorylierung wurden vor allem Dinitrophenol (DNP) und Dinitroorthokresol (DNOK) bekannt. Die beiden Substanzen erwiesen sich als kataraktogen.

Dinitrophenol findet heute nur noch in Industrie und Landwirtschaft Verwendung. Vor mehr als 4o Jahren war es noch ein vielverwendetes Schlankheitsmittel, bis - vorwiegend bei thera-

pierten Frauen - Linsentrübungen beobachtet wurden (z.B. HORNER et al., 1936; WHALMAN, 1936). HORNER (1942) schätzt, daß 0,86 % der mit DNP behandelten Patienten Katarakte entwickelten. Morphologisch konnten feine, graue, körnige und streifige Trübungen in und unter der Linsenkapsel festgestellt werden. Im fortgeschrittenen Stadium waren auch die Embryonalnähte erweitert(WHALMAN, 1936) und die Linse gequollen.

Auch Dinitroorthokresol, welches vorwiegend in Skandinavien in den 30-er Jahren als Schlankheitsmittel Verwendung fand, zeigte eine kataraktogene Wirkung. MAHLEN (1938) beschrieb die morphologischen Veränderungen einer Dinitroorthokresol-Katarakt und stellte weitgehende Übereinstimmung mit der Pathologie der Linse nach Dinitrophenol fest.

Schon CASENEUVE & LEPINE (1885)(zit. nach HORNER, 1936) hatten beobachtet, daß DNP den Grundumsatz von Tieren so steigern konnte, daß sie schließlich im Fieber starben.

2,4-Dinitrophenol entkoppelt die oxydative Phosphorylierung. Ein mit dieser Substanz vergifteter Organismus wird, um seine Energiebilanz stabil zu halten, die Substratketten-Phosphorylierung forcieren müssen, also Glykogen- und Fettreserven über die Glykolyse abbauen. Dieser Stoffwechselweg ist aber für den Gesamt-Organismus energetisch weniger ergiebig. Deshalb steigt der Grundumsatz kompensatorisch an. Welche Mechanismen nach DNP-Einnahme zur Linsentrübung führen, konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden.

FIELD et al. (1937) berichteten über in-vitro-Versuche mit Kaninchenlinsen. Bei niedrigen Konzentrationen von 2,4-Dinitrophenol in der Nährlösung soll der $O_2$-Verbrauch stimuliert, bei höheren Konzentrationen gehemmt worden sein. Auch KLEIFELD & HOCKWIN (1956) untersuchten die Wirkung von DNP auf Kaninchen- und Schweinelinsen in vitro. Sie fanden, daß der Milchsäuregehalt anstieg, während der $O_2$-Verbrauch abnahm. Mit einem Verzögerungseffekt war auch ATP herabgesetzt. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß die oxydative Verbrennung gehemmt und nur die anaerobe Glycolyse möglich sei. OGINO & YASUKURA (1957) diskutierten, ob ein Metabolit von 2,4-DNP, das 2-Amino-p-chinonimin, als auslösende Kataraktnoxe in Frage komme.

An gesunden Versuchstieren konnten mit DNP zunächst keine Katarakte ausgelöst werden. Auch eine zusätzliche Anwendung von Vitaminmangeldiäten (TAINTER & BORLEY, 1938) konnte eine Linsenschädigung durch DNP an Ratten oder Meerschweinchen nicht auslösen. Nur BETTMAN (1946), der die Substanz im Langzeitversuch an adipöse Mäuse verfütterte, konnte bei Säugern durch DNP Linsentrübungen hervorrufen.

Experimentell ließ sich bei Enten und Küken eine akute, reversible 2,4-Dinitrophenol-Katarakt erzeugen, wenn die Substanz per os verabreicht wurde (ROBBINS, 1944). Diese Katarakt läßt sich aufgrund ihrer anderen Morphologie, ihrer geringeren Latenzzeit von 30 Minuten und ihrer Reversibilität mit der klinisch beobachteten Trübung allerdings nicht vergleichen.

### 2.1.2 Cholinesterasehemmer

Auch die Gruppe der bei Glaukom therapeutisch benutzten Miotika hat sich in den letzten 2o Jahren als linsengefährdend erwiesen. Hier sind besonders die Miotika vom Typ der irreversiblen Cholinesterasehemmer, wie Diisopropylfluorphosphat (DFP) (DIAMANT, 1954), Echothiophat (Phospholinjodid)(AXELSON, 1973) und Mintacol (MÜLLER et al., 1956) zu nennen. Auch das Parasympathomimetikum Pilocarpin (MÜLLER et al., 1956) und der Neurotransmitter Acetylcholin selbst (MESTER et al., 1977) können kataraktogen wirken.

Nach Applikation der Cholinesterasehemmer entwickelten sich im Anfangsstadium subcapsuläre Vakuolen in der vorderen Linsenrinde, z.T. auch faserige Rindentrübungen und Wasserspalten (MÜLLER et al., 1956). Im Gegensatz dazu hatte KREIBIG (1954) nach Anwendung von DFP-Öl eine reversible hintere Rosettentrübung festgestellt. Bei den von MESTER et al. (1977) beobachteten Trübungen nach Vorderkammerspülung mit Acetylcholin handelt es sich um akute, reversible Linsentrübungen.

Eine Kataraktwegentwicklung durch Miotika konnte im Tierversuch nicht ohne weiteres hervorgerufen werden. So hatten MÜLLER et al. (zit. nach HOCKWIN et. al., 1966) 2%-ige Pilocarpinsalbe mehrere Wochen in den Bindehautsack von Kaninchen appliziert, ohne sichtbare Linsenveränderungen erzeugen zu können. Erst bei zusätzlicher Anwendung weiterer Kataraktnoxen (Röntgenstrahlen: 125 R; Naphthalin) ließ sich anhand einer beschleunigten Eintrübung die linsenschädigende Wirkung dieses Medikaments nachweisen (HOCKWIN et al., 1966). Nur durch Injektion von subletalen Dosen verschiedener irreversibler Cholinesterasehemmer in die Carotis gelang es DIAMANT (1954) akute, reversible Trübungen zu induzieren. Erst vor kurzer Zeit konnten KAUFMANN et al. (1977) mit Echothiopat bei Primaten Linsentrübungen erzeugen, die den klinisch beobachteten ähnelten. Die Trübungsentwicklung verlief nach operativer Entfernung der Iris beschleunigt.

Der Wirkungsmechanismus der Miotika an der Linse ist nicht bekannt. Zwar hat sich das Enzym Cholinesterase in der Linse nachweisen lassen, seine Funktion in der Linse ist jedoch noch unklar. Es werden mehrere mögliche Enzymfunktionen in der Linse diskutiert: so ein Einfluß auf die Zellmembranpermeabilität, eine Änderung des Kationentransports oder ein Schutz der Zellmembranen gegen Acetylcholin aus der Umgebung (MICHON & KINOSHITA, 1967).

Schon 1956 hatten MÜLLER et al. ein Absinken des Sauerstoffverbrauchs der Linsen von Hunden, Schweinen und Menschen bei Inkubation mit Pilocarpin festgestellt. HOCKWIN et al. (1966) berichtete, daß Linsen, die mit Pilocarpin inkubiert worden waren, Veränderungen im Gehalt säurelöslicher Phosphate zeigten, ein Phänomen, das besonders die Bereitstellung von Stoffwechselenergie zu betreffen schien. Auch wurden Veränderungen der Aktivität der Glukose-6-phosphatdehydrogenase festgestellt.

Bereits im 2. Weltkrieg trug man sich mit dem Gedanken, Anticholinesterasen als Giftgase einzusetzen, da sie eine Lähmung der Atemmuskulatur bewirken können. Heute finden Substanzen dieser Stoffgruppe als Insektizide weite Verbreitung.

PIETSCH et al. (1972) untersuchten 60 Arbeiter, die längere Zeit Organophosphatverbindungen vom Typ der Anticholinesterasen

ausgesetzt waren. Die an drei Augen festgestellten kataraktogenen Veränderungen konnten nicht eindeutig dem Einfluß der Pestizide zugeschrieben werden.

TAMURA & MITSUI (1975) wiesen auf einen Zusammenhang zwischen dem Verbrauch von Organophosphatpestiziden in Japan und der Kurzsichtigkeit von Schulkindern hin. Da Kurzsichtigkeit durch eine Quellung der Linse verursacht werden kann, läßt sich eine Linsenstoffwechselschädigung nicht ausschließen.

HADDAD (1975) wies darauf hin, daß auch DMSO in der Lage ist, das Enzym Cholinesterase zu hemmen.

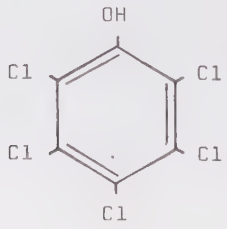
Linsentrübungen an Versuchstieren durch DMSO wurden erstmals von RUBIN & MATTIS (1966) beobachtet. KLEBERGER & GORDON (1967) sowie SMITH et al. (1969) konnten ähnliche Veränderungen nachweisen. Es handelt sich um eine Verdichtung und vermehrte Opaleszenz des Linsenkerns, die zur Entwicklung einer "Linse mit doppeltem Brennpunkt" führen.

## 2.2 Umweltchemikalien

### 2.2.1 Pentachlorphenol

#### 2.2.1.1 Struktur, chemische und physikalische Eigenschaften

Pentachlorphenol ist ein vollchloriertes Phenol mit der chem. Formel $C_6Cl_5OH$ und der Strukturformel



| | |
|---|---|
| Molekulargewicht | 266,5 |
| Schmelzpunkt | 191°C |
| Siedepunkt | 312°C |
| Dichte | 1,978 |
| Wasserlöslichkeit | 14-19 ppm bei 2o-3o°C |
| Flüchtigkeit | $\frac{0,167\ g}{1oo\ g}$ Dampf bei 1 Atm. |

Pentachlorphenol kristallisiert monoklin, prismatisch, hat schwachen aber stechenden Geruch. Es ist in Wasser nahezu unlöslich, jedoch gut löslich in organischen Lösungsmitteln, Ölen und Petroleum sowie anderen Kohlenwasserstoffen mit hohem aromatischem und Ölanteil. Pentachlorphenol läßt sich deshalb gut in Emulsionen anderer Pestizide einschließen. Pentachlorphenol und sein $Na^+$-Salz zersetzen sich erst nach Erhitzung auf 300°C über 24 Std. und werden dann unwirksam.

Handelsnamen: Preventol P
Dowicide 7
Santophen 20
Cryptogil OL (Ulmann, 1954)

2.2.1.2 Synthese

Pentachlorphenol kann hergestellt werden:

a) aus Trichlorphenol durch Chlorierung bei über 100°C in Anwesenheit von 3 - 4 % Eisenchlorid;

b) aus Phenol und Chlor bei 120°C in Anwesenheit von Aktivkohle und tertiären Basen;

c) aus Hexachlorbenzol, welches mit konz. wässriger NaOH bei 140°C unter Druck umgesetzt wird (SANDERMANN, 1974).

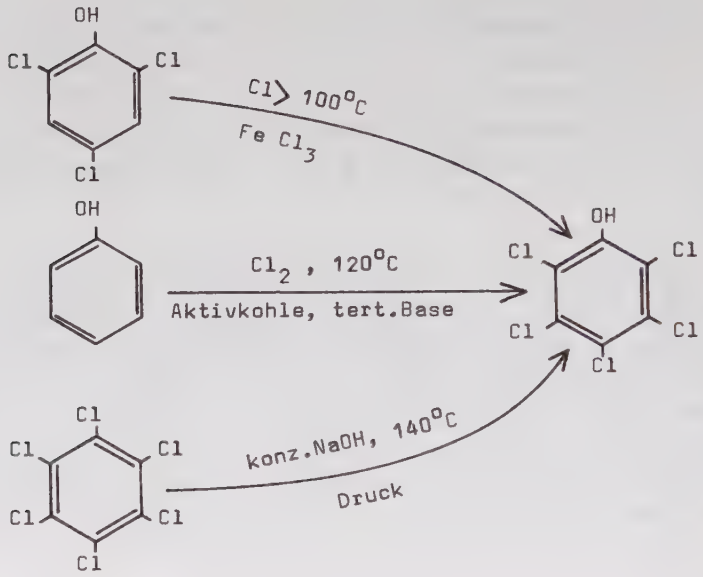



Abb. 1 : Synthesewege für Pentachlorphenol (nach SANDERMANN, 1974)

Die Weltjahresproduktion betrug 1974 ca. 20 000 Tonnen. Von 1968 bis 1971 wurden allein in Japan 48 600 Tonnen Pentachlorphenol produziert und verbraucht. Dabei wurden im Jahr 1973 242,9 ha Ackerland, vorwiegend Reisfelder, mit dem Herbizid behandelt (MATSUNAKA & KAWATSUKA, 1975; SANDERMANN, 1974). Bedingt durch die technischen Herstellungsverfahren finden sich in den gängigen Handelsprodukten von Pentachlorphenol in unterschiedlichem Ausmaß weitere, z.T. hochtoxische, Substanzen (SCHWETZ et al., 1974).

Auch beim Verbrennen von Holz oder bei dem üblichen Verbrennen der Baumwollstengel entstehen bei Pentachlorphenolbehandelten Kulturen giftige Reaktionsprodukte, z.B. Tetrachlordibenzodioxin.

Aus diesen Gründen ist Pentachlorphenol bereits in einigen Ländern für bestimmte Anwendungszwecke verboten worden, z.B. in Schweden das Na-Salz für die Imprägnierung von Schnittholz und als Schleimbekämpfungsmittel in der Zellstoff-Industrie (SANDERMANN, 1974).

2.2.1.3 Vorkommen

Landwirtschaft

Als Herbizid, speziell zum Vernichten von Unkräutern in der Vorerntezeit auf Weideland, Ananas- und Zuckerrohr-Plantagen (GORDON, 1956); auf Reisfeldern in Japan; als Mittel zum gleichmäßigen Reifen, Entblättern und Öffnen von Baumwollkapseln und als Winterspritzmittel in Emulsion mit Anthracenöl und liquinsulfonsaurem Ammoinium (ULLMANN, 1954). Pentachlorphenol wird auch als Molluscucid zur Bekämpfung von Schnecken und Wurmbefall eingesetzt (WEINBACH, 1957).

Industrie

Hier benutzt man die Substanz als Fungizid und Bakterizid bei der Produktion von Zelluloseprodukten, Stärke, Klebstoff, Eiweiß, Leder, Ölen, Farben und Gummi. Sie ist Bestandteil von Vollwaschmitteln und Textilien, die vor Vermoderung geschützt werden sollen.

Die Bau-, speziell die Bauholzindustrie, verwendet Pentachlorphenol als Mittel gegen Termiten, Käfer, Holzwürmer. Zu diesem Zweck werden die Hölzer, Pfosten, Balken mit dem Wirkstoff in Puderform oder in gelöster Form imprägniert (DOW , 1962; zit. nach BEVENUE, 1967). Auch Möbelpolitur wird es zugesetzt (CAMBELL, 1952).

### 2.2.1.4 Stoffwechsel und Ausscheidung

Da 2,4-DNP bereits als Entkoppler der Atmungskette bekannt war, stellte WEINBACH (1954) Nachforschungen an, ob Pentachlorphenol on ähnlicher Weise auf den Stoffwechsel wirken kann. Er fand damals, daß Pentachlorphenol an der Rattenleber in vitro die Atmung und den Sauerstoff-Verbrauch beschleunigte. DEICHMANN (1943) hatte an Kaninchen in vivo ähnliche Beobachtungen gemacht. WEINBACH erkannte weiter, daß Pentachlorphenol in frischen Lebermitochondrienpräparaten den Abbau von ATP steigerte, die Freisetzung von anorganischem Phosphat förderte und bei niedrigen Konzentrationen die Aufnahme von anorganischem Phosphat ins Mitochondrium verhinderte. Im Gegensatz zu DNP hatte Pentachlorphenol eine zweifache Wirkung auf die mitochondriale ATP-ase (WEINBACH, 1956). In niedrigen Konzentrationen ($5 \times 10^{-5}$ M) steigert es die ATP-ase Aktivität und damit den Abbau von ATP, in höheren Konzentrationen ($5 \times 10^{-4}$ M) hemmt es die ATP-ase Aktivität reversibel.

Weitere in vivo-Versuche (WEINBACH, 1957) ergaben, daß sich in Schnecken, die kurzfristig Pentachlorphenol-Konzentrationen von $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ M ausgesetzt wurden, die aufgenommene Menge nach 24 h auf $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M kumulierte. Parallel dazu änderte sich ihr Stoffwechsel. Pyruvat, Acetat, Laktat und Orthophosphat-Spiegel stiegen überdimensional an. Laktat und Acetat sind die normalen Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels. Auch in der erhöhten Produktion von Pyruvat und Phosphat spiegelte sich der gestörte Stoffwechsel. Diese Wirkungen waren reversibel, wenn man die Pentachlorphenol-Exposition nach wenigen Stunden abbrach. Niedrige Konzentrationen steigerten bei den Schnecken die Atmungstätigkeit, während bei höheren Konzentrationen die Atmung gehemmt wurde. Das stimmte mit den Beobachtungen von DEICHMANN (1943) bei Ratten und Kaninchen überein. WEINBACH schloß aus seinen Beobachtungen, daß Pentachlorphenol in der Lage war, mit niedrigen Konzentrationen ($2{,}5 \times 10^{-4}$ M) die oxydative Phosphorylierung zu unterbrechen. Kompensatorisch kam es zu einer Steigerung der Glykolyserate, also des anaeroben

Stoffwechsels, um über die Substratketten-Phosphorylierung die Energiebereitstellung zu sichern. Stieg der Pentachlorphenolspiegel auf $2,5 \times 10^{-3}$ M an, so wurde auch die Substratketten-Phosphorylierung unterbunden.

Pentachlorphenol hatte auf die Myosin-ATP-ase den gleichen Effekt wie auf die Mitochondriale-ATP-ase. Diese Versuche ließen vermuten, daß Pentachlorphenol sowohl den intrazellulären Transport als auch die Synthese von ATP unterbinden kann. Bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-3}$ M bewirkte Pentachlorphenol eine starke Schwellung und teilweise Zerstörung der Mitochondrien. Da die Funktion der Atmungskette auch von einer sauberen Trennung der Kompartimente im Mitochondrium abhängt, ist auch dadurch eine Entkopplung möglich. WEINBACH & GARBUS (1965) fanden, daß intakte Rattenlebermitochondrien in der Lage waren, mehr Pentachlorphenol zu binden als zum Entkoppeln der Atmungskette notwendig war. Andere stark halogenierte Phenole, wie z.B. das Trichlorphenol, Dichlorphenol, am leichtesten Monochlorphenol, konnten bei gleicher Konzentration im äußeren Medium in noch größerem Ausmaß in das Innere des Mitochondriums gelangen. Die Bindungsfähigkeit des Mitochondriums war von drei Faktoren abhängig. Sie war proportional der Pentachlorphenol-Konzentration und der Protein-Konzentration im Mitochondrium, aber umgekehrt proportional dem pH-Wert und unabhängig vom aktiven Stoffwechsel. Die Bindung von Pentachlorphenol im Mitochondrium war sehr stabil. Aufgrund der pH-Wert-Abhängigkeit vermutete WEINBACH, daß es sich um eine Ionenbindung handelt. Das lipophile Pentachlorphenol war nicht, wie man vermuten könnte, an die im Mitochondrium reichlich vorhandenen Phospholipide gebunden, sondern an Proteine. Die Bindung schien sehr spezifisch zu sein und erfolgte nur mit einem Serum-Albumin, Myosin, Cytochrom c[10] und einem isolierten Mitochondrienprotein. WEINBACH stellte auch fest, daß das Pentachlorphenol ein Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung in der Stärke von 2,4-DNP sei. Im folgenden ist die Wirkung auf den Stoffwechsel zusammenfassend dargestellt.

Tab. 1 : Die Wirkung von PCP auf den Stoffwechsel nach WEINBACH (1957)

| Konzentration von Pentachlorphenol (M) | In vitro Effekt | Mögliche physiologische Bedeutung |
|---|---|---|
| $10^{-6}$ - $10^{-4}$ | Entkoppeln der oxidativen Phosphorylierung | Störung des oxidativen Metabolismus |
| $10^{-4}$ - $10^{-3}$ | Hemmung der mitochondrialen ATP-ase, Hemmung der Myosin-ATP-ase | Hemmung des Phosphat-Transfers u. der Muskelfunktion |
| $10^{-3}$ und höher | Hemmung der Substratkettenphosphorylierung, Inaktivierung von Atmungsenzymen, Zerstörung der Struktur des Mitochondriums | Schneller Tod der Zelle und des Organismus |

DEICHMANN (1943) gab an, daß Pentachlorphenol nicht an Schwefel- oder Glucuronsäure gebunden ist, sondern unverändert in Urin von Ratten und Kaninchen ausgeschieden wird.

ALBORG et al. (1974) applizierten $^{14}$C-Pentachlorphenol i.p. und oral. Die Urinausscheidung an Radioaktivität lag nach i.p.-Gabe höher als nach oraler Anwendung und bei der Ratte prozentual ebenfalls höher als bei der Maus. 40% der ausgeschiedenen Aktivität bei Ratten und Mäusen stammte aus unkonjungiertem Pentachlorphenol. Neben Pentachlorphenol wurden noch weitere zwei Hauptbestandteile im Urin der Tiere gefunden. Dabei handelte es sich zum einen um Tetrachlorhydrochinon, welches unkonjungiert 40% der Urinausscheidung bei Mäusen ausmachte. Bei dem zweiten Hauptbestandteil handelte es sich um eine Mischung, welche nach Kochen in die zwei Bestandteile Pentachlorphenol und Tetrachlorhydrochinon zerfiel. Es wurde festgestellt, daß Tetrachlorhydrochinon ein starker Hemmer der ß-Glucuronidase ist und die Menge Tetrachlorhydrochinon in Harn von Ratten und Mäusen vollkommen ausreicht, um den Ausfall des Enzyms zu erklären.

### 2.2.1.5 Toxikologie

#### 2.2.1.5.1 Allgemeine Erkrankungen

Eine Vergiftung erfolgt vor allem durch Inhalation beim Versprühen als Herbizid, Pestizid oder Fungizid in der Landwirtschaft, beim Herstellungs- und Anwendungsprozeß in der Industrie sowie bei der Anwendung in Privathaushalten. In geschlossenen Räumen kommt es bevorzugt zu Inhalationsvergiftungen. Häufig ist bei den o.g. Tätigkeiten eine Benetzung der Augen unvermeidlich. Da das Mittel bevorzugt auch in tropischen Gebieten angewendet wird, wo nur Shorts getragen werden, ist ein großflächiger Hautkontakt möglich, so daß sogar die Meinung geäußert wurde, Pentachlorphenol sei bei steigender Hitze giftiger (GORDON, 1956). Seltener kommt es vor, daß Pentachlorphenol per os aufgenommen wurde, sei es durch eine Verwechslung, oder weil es sich an Nahrungsmitteln und im Trinkwasser befand.

Tab. 2 : Vergiftungsfälle durch PCP

| Exposition bei | Vergiftungsfälle | Autor |
|---|---|---|
| Produktion | 17 Arbeiter | BAADER & BAUER (1951) |
| Anwendung | 1 Toter, 1 Vergiftungserscheinung | TRUHAUT et al. (1952) |
| Anwendung | 7 Vergiftungserscheinungen | CAMPBELL (1952) |
| Anwendung | Vergiftungserscheinungen | NOMURA (1954) |
| Anwendung | 5 Tote, 4 Vergiftungserscheinungen | GORDON (1956) |

| | | |
|---|---|---|
| Anwendung | 9 Tote | MENON (1958) |
| Anwendung | 1 Toter, 1 Vergiftungserscheinung | BERGNER et al. (1965) |
| Anwendung | 1 Vergiftungserscheinung | BEVENUE & BECKMANN (1967) |
| Anwendung | Vergiftungserscheinungen | VINOGRADOWNA et al. (1973) |
| Anwendung | 6 Vergiftungserscheinungen | WYLLIE et al. (1975) |
| Anwendung | 1 Tote | ANONYMUS (1977) |

Akute Vergiftungserscheinungen

Die Symptome sind vielseitig. Lokal bewirkt Pentachlorphenol nach kurzer Exposition eine Reizung der äußeren Haut und der Schleimhaut von Nase und Luftwegen, was sich als Juckreiz, Husten, Niesen, Rhinitis und Pharyngitis manifestiert (BAADER & BAUER, 1951; BERGNER et al., 1965). Charakteristisch sind auch Zeichen von Kurzatmigkeit und Beklemmungsgefühl in der Brust. Am Beginn der akuten Pentachlorphenolvergiftung stehen auch Übelkeit, Brechreiz und Leibschmerzen (TRUHAUT et al., 1952; GORDON, 1956; BERGNER et al., 1965). Es ist bei den Vergifteten eine rauschartige Benommenheit zu registrieren, nachdem euphorische Zustände (NOMURA, 1954) mit mangelnder Krankheitseinsicht vorangingen (GORDON, 1956). Der Zustand verschlimmert sich schnell. Besonders hervorzuheben und von allen behandelnden Ärzten betont ist die außerordentlich hohe Transpirationsrate (GORDON, 1956; TRUHAUT et al., 1952). Die Pulsfrequenz steigt bis 156 an (GORDON, 1956), Blässe, Speichelfluß und klonisch-tonische Krämpfe sind zu beobachten (TRUHAUT et al., 1952; BERGNER et al., 1965). Die Pupille ist erweitert. Bei einem Weinbauern aus Frankreich wurden kurz vor dem Tod nach Pentachlorphenolvergiftung eine rectale Temperatur von $43^{o}$ gemessen (TRUHAUT et al., 1952). Der Vergiftete stirbt im Koma (MENON, 1958; BERGNER et al., 1965). Dringen größere Mengen Pentachlorphenol

nur durch die Haut der Hände in den Körper ein, so führt dies zu den gleichen beschriebenen Vergiftungserscheinungen im Organismus. BEVENUE & BECKMANN (1967) schildern einen derartigen Fall, bei dem 48 Stunden nach Exposition die Pentachlorphenol-Blutkonzentration noch 236 ppm betrug. 30 Tage später konnten noch 10 % der Anfangskonzentration festgestellt werden.

Chronische Vergiftungserscheinungen

Fünf Monate nach Beginn ihrer Tätigkeit traten bei Arbeitern in der Pentachlorphenol-Produktion eine ausgeprägte Dermatitis mit Sekundär-Infektionen, Furunkeln und Talgretentionscysten auf (NOMURA, 1954; VINOGRADOWNA et al., 1973). Auch war eine zunehmende braune Pigmentierung der Haut zu beobachten (BAADER & BAUER, 1951; SANDERMANN, 1974). Dazu kamen Reizsymptome der Nasenschleimhäute und des Pharynx. Zugleich mit dem Auftreten der Dermatitiden oder noch Wochen später waren neurasthenische Beschwerden in den unteren Extremitäten, Schwäche in den Beinen, Parästhesien, Impotenz und ein allgemeines Schwächegefühl festzustellen (BAADER & BAUER, 1951; VINOGRADOWNA et al., 1973). Arbeiter, die längere Zeit wiederholt kleineren Dosen Pentachlorphenol ausgesetzt waren (TRUHAUT et al., 1952), klagten über Steifheit der Glieder, Schwächegefühl, starke Transpiration (NOMURA, 1953), Gewichtsverlust (NOMURA, 1953; BERGNER et al., 1965) und Heißhunger nach Zucker (NOMURA, 1953). TRUHAUT gab in einem Fall von chronischer Vergiftung mit Pentachlorphenol Atemstillstand als direkte Todesursache an. GORDON (1956) schildert einen Fall von chronischer Pentachlorphenol-Vergiftung, wo außer den o.g. Symptomen die ausgeatmete Luft nach Aceton roch und der Körper sofort nach dem Tod in Leichenstarre überging. Von WYLLIE et al., (1975) wurden 5 Monate lang Urin- und Blutproben von Pentachlorphenol-Arbeitern gesammelt. Er konnte Jahreszeit-unabhängige, wohl aber von erhöhter Pentachlorphenol-Exposition-abhängige Schwankungen

im Pentachlorphenol-Gehalt von Serum und Urin beobachten. In Leukozytenkulturen waren keine signifikanten Schädigungen von Chromosomen gegenüber nicht Exponierten festzustellen. Laboruntersuchungen ergaben, daß bei 4-8 mg/100 ml Blut erste Vergiftungserscheinungen klinisch feststellbar sind (BEVENUE & BECKMANN, 1967). Die staatlich erlaubte höchste Konzentration in Luft beträgt 0,5 mg/$m^3$ (ULLMANN, 1954).

### 2.2.1.5.2 Erkrankungen am Auge

BAADER & BAUER (1951) erfuhren von 10 Arbeitern eines Pentachlorphenol-produzierenden Betriebes, daß sie unter starken Reizungen der Bindehäute während der Arbeit litten. Nähere Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

TRUHAUT et al. (1952) schildern zwei Fälle, nach denen Winzer beim Versprühen von Pentachlorphenol Reizungen und Bindehautblutungen der Augen davontrugen.

CAMPBELL (1952) schildert insgesamt 7 Fälle, bei denen dreimal Augenschäden auftraten: Alle Personen hatten ein und dasselbe Holzschutzmittel benutzt, um ihre Möbel zu pflegen. Das Mittel enthielt Pentachlorphenol, O-und P-Dichlorbenzin und DDT. CAMPBELL betont, daß es nicht möglich sei zu sagen, von welchem Stoff die Vergiftungserscheinungen ursächlich herrühren, nimmt aber an, daß Pentachlorphenol die Augenschädigung verursacht hat. Alle Vergifteten entwickelten kurz nach dem ersten Kontakt mit dem Material oder später im linken Auge eine Retrobulbärneuritis mit großem Zentralskotom in zwei Fällen und einer Sehschärfe von 6/36 in einem Fall. Bei einem dieser Patienten war der Pyruvat-Toleranz-Test positiv. An weiteren Symptomen traten Kribbeln in den Händen und Parästhesien in den Hüften auf.

GORDON (1956) untersucht neun Fälle von landwirtschaftlichen Arbeitern und warnt vor Kontakt des Gesichts mit Pentachlorphenol.

BERGNER et al. (1965) beschreiben Reizungen der Augen und des oberen Respirationstraktes.

IMAIZUMI et al. (1971) schildern Reizungen der Hornhäute nach Pentachlorphenol-Kontakt.

### 2.2.1.6 Tierversuche

KEHOE et al. (1939) stellten in Versuchen an Kaninchen fest, daß Pentachlorphenol akute Vergiftungserscheinungen hervorruft, die durch Kurzatmigkeit, Fieber, Hyperglykämie, Glukosurie, Rigor Mortis und schließlich Kollaps gekennzeichnet sind. Bei der histo-pathologischen Untersuchung wurden ausgedehnte Zerstörungen des Gefäßsystems und der parenchymatösen inneren Organe festgestellt. Pentachlorphenol wird durch die Haut von Kaninchen in die Blutbahn resorbiert. Die allgemeinen als auch die lokalen Wirkungen von Pentachlorphenol werden durch die Art des Lösungsmittels beeinflußt. Die $LD_{50}$ von Pentachlorphenol bei oraler Applikation im Lösungsmittel Olivenöl betrug 110 mg/kg Lebendgewicht. Bei Lösung in Wasser und Applikation an der Haut betrug die $LD_{50}$ 257 mg/kg Lebendgewicht. In Wasser oral appliziert ergab sich eine $LD_{50}$ von 218 mg/kg Lebendgewicht. Es fanden sich keine Anzeichen, daß eine chron. Vergiftung möglich sei. Das Durchschnittsgewicht der Versuchstiere war erniedrigt.

DEICHMANN et al. (1942) führten Versuche mit Hunden, Kaninchen, Ratten und Schweinen durch. Wiederholte Gaben von Pentachlorphenol führten zu Gewichtsverlust, Fieber und Ansteigen der Blutzuckerwerte. Die intestinale Absorption von Pentachlorphenol begann sofort nach der Einnahme. Der Blutwert erreichte seinen Höhepunkt in sieben Tagen. 70 % der oral verabreichten Menge von Pentachlorphenol sollen durch das Kaninchen im Urin ausgeschieden, 9 % abgebaut und geringe Mengen mit den Fäces ausgeschieden werden.

DEICHMANN (1943) stellte an Kaninchen fest, daß bei einer täglichen Gabe von 1 mg Pentachlorphenol pro kg Lebendgewicht per os in 0,25 % Lösung keine Akkumulation im Blut, wohl aber eine gesteigerte Urinausscheidung festzustellen ist.

HERDT et al. (1951) verabreichten drei jungen Bullen 7,6 mg Pentachlorphenol pro kg Lebendgewicht pro Tag fünf Wochen lang in Trinkwasser. Es konnten sowohl klinisch als auch histopathologisch keine Schäden an den Tieren festgestellt werden.

KIMMIG (1957) führte Versuche an Kaninchenohren mit chemisch reinem Pentachlorphenol durch. Er wies nach, daß dieser Stoff keine Chlorakne verursachte und führte allgemein Dermatitiden nach kommerziellem Pentachlorphenol auf dessen Gehalt an TCDD zurück.

LARSEN et al. (1972) gaben Ratten 37 mg pro kg Lebendgewicht $^{14}C$ markiertes Pentachlorphenol per os und registrierten sowohl die ausgeschiedene als auch die im Gewebe verbliebene Menge. Die durchschnittlich 10 Tage lang im Urin der Tiere gemessene Aktivität betrug 68,3 % der verabreichten Aktivität. In Blut, Niere und Lunge war die größte Menge aller Gewebs-Aktivitäten zu finden. Im Blut waren 99 % an Serumproteine gebunden.

JOHNSON et al. (1973) stellten ausgehend von der Tatsache, daß kommerziell hergestelltes Pentachlorphenol mit TCDD verunreinigt ist, in vergleichenden toxikologischen Studien an Kaninchen, Kühen und Ratten fest, daß die Gabe von chemisch reinem Pentachlorphenol nur zu einer Erhöhung des Nieren- und Lebergewichts führt, aber keine Zerstörung der Hautoberfläche, Chlorakne und Organzerstörung verursacht, Wirkungen, die kommerzielles Pentachlorphenol hervorrufen kann.

SCHWETZ et al. (1974) unternahmen Versuche an schwangeren Ratten und stellten fest, daß bei einer Gabe von 5 mg pro kg pro Tag Pentachlorphenol keine Veränderungen an Neugeborenen hervorrief. Das Gewicht der Muttertiere verringerte sich allerdings. In höherer Dosis verursachte Pentachlorphenol in den ersten 8 bis 10 Tagen der Schwangerschaft die größten Schäden an Embryonen. Die Sterblichkeit der weiblichen Embryonen stieg schneller an als die der männlichen.

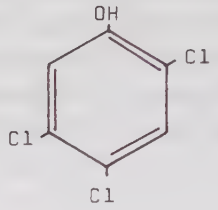
KNUDLSEN & VERSCHUREN (1974) fütterten Ratten 12 Wochen mit einer Pentachlorphenol-Diät. Das Gewicht der Leber war erhöht und die mikrosomalen Leberenzyme zeigten eine größere Aktivität. In der 6. Woche wurden höhere Hb- und Hämatokrit-Werte gefunden. Bei 25 ppm lag die Grenze, bei der keine Vergiftungserscheinungen mehr beobachtet werden konnten.

BRAUN & SAUERHOFF (1976) bestimmten die Halbwertzeit von Pentachlorphenol bei Rhesusaffen. Es wurde eine einmalige Dosis von 10 mg/kg $^{14}C$ Pentachlorphenol in Maisöl verabreicht. Die Halbwertzeit von Pentachlorphenol im Plasma betrug 83,5 Stunden bei den weiblichen und 72 Stunden bei den männlichen Tieren. Die Halbwertzeit der Exkretion betrug 92,4 Stunden für weibliche und 4o,8 Stunden für männliche Tiere. Die gesamte ausgeschiedene Aktivität im Urin wurde als Pentachlorphenol identifiziert.

## 2.2.2 2,4,5 - Trichlorphenol

### 2.2.2.1 Struktur, chemische und physikalische Eigenschaften

Formel: $C_6Cl_3OH$




2,4,5 - Trichlorphenol

| | |
|---|---|
| Molekulargewicht | 197,46 |
| Schmelzpunkt | 66°C |
| Siedepunkt | 243°C |
| Dichte | 1,503 bei 70°C |

2,4,5 - Trichlorphenol bildet farblose, stark phenolartig riechende Nadeln, ist flüchtig, schwer löslich in kaltem Wasser, leicht löslich in polaren organischen Lösungsmitteln, Alkohol, Äther, Aceton (RÖMPP, 1977).

Handelsnamen

Dowicide 2
Dowicide B, Preventol flüssig (Na-Salz von 2,4,5-Trichlorphenol)
Dowicide 9 B, Seedox (Zink-Salz von 2,4,5-Trichlorphenol)
Fenthiuram (Cu-Salz von 2,4,5-Trichlorphenol)
(Pestizide Dictionary 1974; ULLMANN, 1954; ANDERSON et al., 1949).

Die Jahresweltproduktion von 2,4,5 - Trichlorphenol betrug 1800 t. Der Jahresverbrauch in der BRD belief sich auf 375 t (VAHRENHOLT, 1977).

2.2.2.2 Synthese

2,4,5-Trichlorphenol kann technisch hergestellt werden:
a) durch Umsetzen von Tetrachlorbenzol mit NaOH und Methanol bei 160° unter Druck;
b) drucklos durch Erhitzen von Tetrachlorbenzol mit Alkalien und Äthylen- oder Propylenalkohol;
c) durch Chlorierung von 2,5-Dichlorphenol
(ULLMANN, 1954; ANONYMUS, 1976).

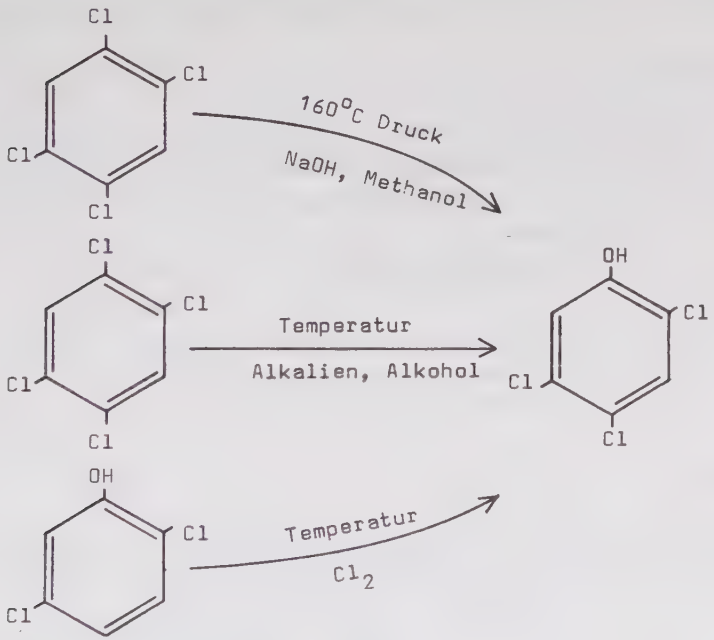



Abb. 2: Synthesewege für 2,4,5 - Trichlorphenol(nach ULLMANN, 1974)

### 2.2.2.3 Verwendung und Vorkommen

Landwirtschaft

In der Landwirtschaft findet 2,4,5-Trichlorphenol als Fungizid und Bakterizid Verwendung. Das Kupfersalz von 2,4,5-Trichlorphenol wird zum Beizen von Baumwoll-Saatgut und Bohnen-Saatgut verwendet (MELNIKOW, 1971). Eine vielseitige Verwendung kommt auch dem Natriumsalz von 2,4,5-Trichlorphenol zu als Beizmittel für Naturgummi, Leder, Klebstoffe, Farben, Textilien (Pesticide Dictionary, 1974; DITTMER, 1959).

Industrie

In der Industrie ist 2,4,5-Trichlorphenol Ausgangsprodukt für die Synthese von Desinfektionsmitteln, die zur Erhöhung der Haltbarkeit von Salben und Pudern auf der Basis von Hexachlorophen eingesetzt werden. Ebenso ist 2,4,5-Trichlorphenol Ausgangsprodukt bei der Herstellung von 2,4,5-Trichlorophenoxyazetat, eines heute in großen Mengen produzierten Herbizids. Ferner liefert 2,4,5-Trichlorphenol den Grundstoff zur Produktion von Insektiziden mit den Handelsnamen Ronnel$^{R}$ und Trichlormetafos$^{R}$ (ANONYMUS, 1976 ; MELNIKOW, 1971).

Metabolit

Rückstandsanalysen ergaben, daß 2,4,5-Trichlorphenol als Metabolit nach Anwendung von Pestiziden in Tieren, Pflanzen und Naturprodukten auftritt. An Ratten wurde festgestellt, daß das Pestizid a-Hexachlorcyclohexan, bekannt unter dem Handelsnamen Lindan$^{R}$ im Organismus durch Dechlorierung in Trichlorphenole umgewandelt wird (CHADWICK & FREAL, 1972). GRUNOW & BÖHME (1974) führten Versuche an Ratten und Mäusen mit dem bereits erwähnten Herbizid 2,4,5-Trichlorphenoxyazetat durch und fanden, daß dieser Stoff sowohl unverändert als auch konjungiert an Glyzin und Taurin ausgeschieden wird. Es trat

aber auch 2,4,5-Trichlorphenol im Harn der Ratten und Mäuse auf, und zwar in 4 Tagen 2,3 % - 3,9 % der verabreichten Dosis.

LE ROY BEJERKE et al. (1972) verfütterten 2,4,5-Trichlorphenoxyazetat zwanzig Tage an Kühe und konnten feststellen, daß bereits nach dem zweiten Tag des Versuchsbeginns 2,4,5-Trichlorphenol in großen Mengen in der Milch und im Rahm der Tiere zu finden waren.

FITZGERALD et al. (1967) besprühten Baumkulturen mit einem n-Butylester von 2,4,5-Trichlorphenoxyazetat (2,4,5-T) und fanden, daß dieses Herbizid in den getesteten Pflanzen zu 2,4,5 - Trichlorphenol abgebaut wird.

PLAPP & CASIDA (1958) untersuchten den Abbau von (O,O-Dimethyl-O-2,4,5-Trichlorphenyl) Phosphothioat, Handelsname Ronnel$^{R}$, welches als Insektizid dazu dient, Viehbestände von Ungeziefer zu befreien. Es wird auch in Sprayform zur Fliegenbekämpfung eingesetzt. Die Substanz wurde in den untersuchten Kühen, Rindern, Ratten und Fliegen durch Hydrolyse gespalten, wobei 2,4,5-Trichlorphenol als einer der Metaboliten entstand.

### 2.2.2.4 Stoffwechsel und Ausscheidung

LOOMIS (1949) fand bei seinen Versuchen, daß neben 2,4-Di - nitrophenol auch 2,4,5-Trichlorphenol in der Lage ist, die oxydativa Phosphorylierung zu entkoppeln.

WEINBACH (1965) untersuchte das Verhalten von 2,4,5-Trichlorphenol gegenüber Mitochondrien und stellte Vergleiche zu dem Entkoppler Pentachlorphenol an. Nachdem er 2,4,5- Trichlorphenol mit intakten Rattenlebermitochondrien inkubiert hatte, erhielt er die auf Tab. 3 zusammengestellten Werte.

Tab. 3: Die Bindung von 2,4,5-Trichlorphenol im Mitochondrium (WEINBACH, 1965)

| | 2,4,5-Trichlor-phenol | Pentachlor-phenol |
|---|---|---|
| Konzentration im Außenmedium, bei der die Atmungskette entkoppelt wurde (M) | $5 \times 10^{-5}$ | $2 \times 10^{-5}$ |
| Konzentration im Mitochondrium selbst (µmol/mg Protein) | 7,1 | 2,8 |
| % - gebundene Substanz | 50 | 54 |
| pK | 7 | 4,8 |

Es fand sich also, verglichen mit Pentachlorphenol, eine größere Menge an 2,4,5-Trichlorphenol im Mitochondrium bei totaler Entkoppelung der Atmungskette. WEINBACH inkubierte dann 2,4,5-Trichlorphenol mit intakten Mitochondrien und mit reinem Mitochondrienprotein. Die Konzentration im Außenmedium reichte für die totale Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung aus.

Tab. 4: Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung durch 2,4,5-Trichlorphenol und PCP (WEINBACH, 1965)

| | | 2,4,5-Trichlorphenol | Pentachlorphenol |
|---|---|---|---|
| Gebundene Chlorphenole in % | Intakte Mitochondrien | 44 | 53 |
| | Mitochondrienprotein | 48 | 70 |
| Relatives Ausmaß der Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung, wenn man Pentachlorphenol = 100 setzt | | 39 | 100 |

Dieser Versuch zeigt, daß die Fähigkeit zur Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung bei 2,4,5-Trichlorphenol weniger ausgeprägt ist als bei Pentachlorphenol. Um die Stabilität der Bindungen von 2,4,5-Trichlorphenol in gesättigten, intakten Rattenleber-Mitochondrien zu prüfen, wurden diese wiederholten Waschungen mit einer 0,25 M Sucrosesuspension unterworfen. Hier zeigte sich an dem Prozentsatz des nach 6 Waschungen noch im Mitochondrium gebundenen Materials, daß die Bindungen von 2,4,5- Trichlorphenol sich schneller auflösen ließen als die von Pentachlorphenol. Der Autor sah eine Proportionalität zwischen der Bereitschaft eines Entkopplers, sich vom Mitochondrium zu lösen, und seinem Wirkungsgrad. Die Wirkungsweise von 2,4,5-Trichlorphenol im Organismus ist also prinzipiell

mit der von Pentachlorphenol zu vergleichen. Allerdings ist sowohl die Wirkung auf die Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung als auch die Wirkungsdauer geringer als bei Pentachlorphenol.

PARKER (1958) untersuchte die Wirkungen von Nitrophenolen und Halogenphenolen in ähnlicher Weise und prüfte darüber hinaus die Wirkung der Substanzen auf die mitochondriale ATP-ase. Im folgenden sind einige seiner Resultate zusammengefaßt.

Tab. 5: Die Wirkung von 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol auf die mitochondriale ATP-ase (PARKER, 1958)

| | Konzentration (M)von DNP | Konzentration (M)von 2,4,5-Trichlorphenol | Konzentration (M) von Pentachlorphenol |
|---|---|---|---|
| 50 % Hemmung der P:O Rate | $1 \times 10^{-5}$ | $4{,}0 \times 10^{-5}$ | $9{,}0 \times 10^{-6}$ |
| max. Aktivität der ATP-ase | $2{,}7 \times 10^{-5}$ | $1{,}0 \times 10^{-4}$ | $9{,}2 \times 10^{-6}$ |
| max. Aktivität der Substratkettenphosphorylierung | $2{,}0 \times 10^{-5}$ | $1{,}8 \times 10^{-4}$ | $1{,}0 \times 10^{-5}$ |

Trichlorphenol wirkt also,höher konzentriert, ähnlich wie Pentachlorphenol auf die mitochondriale ATP-ase. 2,4,5-Trichlorphenol wird im Organismus als Konjungat der Glucuronsäure und Schwefelsäure (GROWER, 1965), als Konjungat von Glyzin und Taurin, aber auch frei im Harn ausgeschieden (GRUNOW, 1974). Ebenso in ungebundenem Zustand läßt es sich in der Milch von Kühen feststellen (LE ROY BJERKE et al., 1972).

### 2.2.2.5 Toxikologie

#### 2.2.2.5.1 Allgemeine Erkrankungen

2,4,5-Trichlorphenol wird beim Beizen von Saatgut eingeatmet. Auch beim Sprühen von Desinfektionsmitteln gelangt es über die Luftwege in den menschlichen Körper. Arbeiter der chemischen Industrie können bei der Herstellung und Verarbeitung von 2,4,5-Trichlorphenol kontaminiert werden, wobei der Stoff per os, möglicherweise auch durch Hautkontakt in den Körper gelangen kann. Bei all diesen Arbeiten können auch die Augen benetzt werden. In der Literatur sind einige Vergiftungsfälle angeführt worden, die sich in Trichlorphenolbetrieben ereignet haben, wobei der Fall Seveso (SANDERS, 1976; FORTH, 1977) besondere Publizität errang. Im folgenden sind die in der Literatur gesichteten Fälle aufgeführt.

Tab. 6: Vergiftungsfälle mit 2,4,5-Trichlorphenol

| Produktion Verarbeitung | Fälle | Jahr | Autor |
|---|---|---|---|
| Produktion | 60 | 1955 | HERGT, W. (1955) zit. nach BAUER et al. (1961) |
| Verarbeitung | 31 | 1955 | BAUER et al. (1961) |
| Produktion | 42 | 1953 | GOLDMANN (1972) |
| Produktion | 50 | 1963 | HAY (1976) |
| Produktion | 79 | 1973 | MAY (1973) |
| Produktion | 350 | 1976 | SANDERS (1976) |

Auch VAHRENHOLT (1977) sowie GALLMAYER & SCHULTEN (1975) berichteten jeweils über 2,4,5-Trichlorphenol-Vergiftungsfälle, ohne genauere Zahlenangaben über die Betroffenen zu veröffentlichen.

BAUER et al. (1961), GOLDMANN (1972), KLEU & GÖLTZ (1971) unternahmen ausführliche Untersuchungen mit z.T. einer Zeitdauer von 15 Jahren an Trichlorphenol-exponierten Arbeitern, die Befunde an Haut und Schleimhäuten, inneren Organen und neurologisch-psychopathologische Ausfälle hervorbrachten. Auch JENSEN et al. (1972), MAY (1973), SANDERMANN (1974) und Berichte von SANDERS (1976) trugen dazu bei, das Bild von Vergiftungen durch Trichlorphenol-Anlagen zu vervollständigen.

Tab. 7 : Akute und chronische Vergiftungserscheinungen durch 2,4,5 - Trichlorphenol

| | | BAUER (1961) | KLEU (1971) | GOLDMANN (1972) | JENSEN (1972) | MAY (1973) | SANDERMANN (1974) | SANDERS (1976) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Akute Vergiftung | Haut u. Schleimhäute: | | | | | | | |
| | Gesichtsdermatitis im Beginn | + | | + | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | Comedonen, Retentionscysten, Knötchen, Furunkel | ++ | | + | | + | + | + |
| | Pigmentierungen | + | | | | | | |
| | Blepharo-Conjunctivitis | ++ | | ++ | + | | | |
| Chronische Vergiftung | Innere Organe: | | | | | | | |
| | Appetitlosigkeit | + | + | | | | | |
| | Abdominelle Beschwerden | + | + | | | | | |
| | Gewichtsverlust | + | + | + | | | | |
| | Hörstörung | | | + | | | | |
| | Riechstörung | | | ++ | ++ | | | |
| | Leberschaden | Verdacht | | + | | | | |
| | Lungenemphysem | + | + | + | | | | |
| | Myocardschaden | + | + | + | | | | |
| | Schwitzen, kochende Haut | Verdacht | + | + | | | | |
| | Nierenschaden | + | | + | | | | |
| | Nervensystem-neurologisch: | | | | | | | |
| | Muskelschmerzen | + | + | | | | | |
| | Schwäche in d. Beinen | + | ++ | | + | | | |
| | Allg. Müdigkeit | + | + | + | + | | | |
| | Paraesthesien | + | + | | | | | |
| | Kopfschmerzen | + | + | ++ | | | | |
| | orthostatische Kollapsneigung | + | | | | | | |
| | Reflexabweichungen | + | | + | | | | |
| | vegetative Übererregbarkeit | + | ++ | | | | | |
| | Nervensystem-psychopathologisch: | | | | | | | |
| | Hyperaesthetisch-emotion. Züge | ++ | ++ | | | | | |
| | Libido u. Potenzstörungen | ++ | + | | | | | |
| | Alkohol-Intoleranz | ++ | +++ | | | | | |
| | Depressive Verstimmungsmomente | + | + | | | | | |
| | Antriebsminderung | + | +++ | | | | | |
| | Hirnleistungsschwäche | ++ | ++ | | | | | |

Nachdem die ersten Vergiftungsfälle von Trichlorphenolarbeitern bekannt wurden, lag es nahe, auch 2,4,5-Trichlorphenol als Ursache dieser Kontaminierung anzusehen. Als erste wiesen KIMMIG & SCHULZ (1957) nach, daß nicht 2,4,5-Trichlorphenol selbst, sondern insbesondere 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin als Ursache - zumindest für die initiale Dermatose nach Trichlorphenol - in Frage kommt, wenn nicht auch für die weiteren pathologischen Befunde. TCDD entsteht in 2,4,5-Trichlorphenol herstellenden und verarbeitenden Betrieben in äußerst geringen Mengen als Nebenprodukt. Nur wenn die Temperatur im Reaktionsansatz übernormal ansteigt, werden große Mengen TCDD frei. Es können aber auch in kommerziell hergestellten Fertigprodukten von 2,4,5-Trichlorphenol solche Verunreinigungen vorhanden sein (KIMMIG & SCHULZ, 1957). Die Firma Dow Chemicals führte Versuche an 200 Menschen durch um herauszufinden, ob 2,4,5-Trichlorphenol Veränderungen an der Haut hervorruft. 5 % - ige Lösung in Sesam-Öl verursachte eine leichte Reizung, bei längerem Kontakt aber gab es keine Dermatosen (COLLISTER et al., 1961).

### 2.2.2.5.2 Erkrankungen am Auge

Hier stehen akute Blepharo-Conjunctividen, die dann in den meisten Fällen chronischen Verlauf nehmen, im Vordergrund. BAUER et al. (1961), GOLDMANN (1972), MAY (1973), MC.COLLISTER et al. (1961) gaben an, daß überhitzter 2,4,5-Trichlorphenolstaub Schmerzen und Reizungen der Augen und Nase verursacht, sonst aber keine Gefahr darstellt. Es sollte aber auf alle Fälle vermieden werden, die Augen mit einer 10 % - igen oder stärkeren 2,4,5-Trichlorphenol-Lösung zu vergiften.

BAUER et al. (1961) bemerkten eine besondere Lichtempfindlichkeit bei 2,4,5-Trichlorphenolarbeitern.

RICHARD (zit. nach KLEU & GÖLZ, 1971) stellte leichte lokomotorische Ataxie, feinschlägigen Nystagmus und Hemihypästhesien fest.

GOLDMANN (1972) notierte Erkrankungen der Maibom'schen Drüsen an Trichlorphenol-Arbeitern.

2.2.2.6 Tierversuche

Als erster veröffentlichte DEICHMANN (1943) eine derartige Untersuchung. Er stellte fest, daß sowohl oral als auch subkutan gegebene letale Mengen dieselben Vergiftungserscheinungen an Ratten verursachen. Kontaminierte Ratten zeigten Ruhelosigkeit und Kurzatmigkeit wenige Minuten nach der Applikation. Ein paar Minuten später konnte man durch Berühren der Tiere oder Lärm leichten Tremor und leichte klonische Krämpfe auslösen, die mit einer Dyspnoe und Koma im Tod endeten. DEICHMANN stellte in diesem Versuch fest, daß die $LD_{50}$ von 2,4,5-Trichlorphenol, wenn man es per os in 20 % Ölemulsion verabreicht, 0,82 g/kg Lebendgewicht, bei subcutaner Gabe 2,26 g/kg Lebendgewicht beträgt. Als minimalste $LD_{50}$ gabe DEICHMANN & MERGARD (1948) im gleichen Lösungsmittel wie oben für orale Gabe 0,62 g/kg Lebendgewicht, 2,1 g/kg Lebendgewicht für subcutane Gabe an.

ANDERSON et al. (1949) fütterten 16 Bullen mit Baumwollsamenmehl, welches zu 25 % aus dem Zinksalz von 2,4,5-Trichlorphenol bestand. Sowohl in der Gruppe, welche 78 Tage damit gefüttert wurde, als auch in der Gruppe, die 154 Tage gefüttert wurde, traten keine pathologischen Veränderungen auf. Das Fleisch wurde ohne Beschwerden verzehrt, nachdem die Tiere getötet worden waren.

KIMMIG & SCHULZ (1957) führten Versuche mit Kaninchen durch, um die auslösende Noxe von Chlorakne und Leberparenchymschäden zu finden. Sie stellten fest, daß chemisch reines 2,4,5-Trichlorphenol keine der genannten Veränderungen hervorruft, dagegen TCDD bereits in Konzentrationen von $10^{-3}$ mg % charakteristische Veränderungen am Kaninchenohr hervorrief.

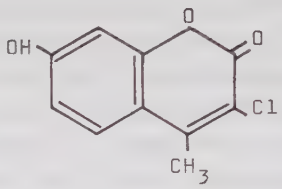
MC.COLLISTER et al. (1961) stellte fest, daß bei einmaliger Applikation per Magensonde die $LD_{50}$ in Ratten 2,53 - 3,46 g/kg Lebendgewicht betrug. Dem Material kommt also eine verhältnismäßig niedrige akute Toxizität bei oraler Gabe zu. Weitere Versuche ergaben, daß ungelöstes 2,4,5-Trichlorphenol nicht in der Lage war, Hautreizungen an Kaninchen hervorzurufen. Höhere Konzentrationen aus gelöstem Material verursachten ein schwaches

Erythem der Haut. Wiederholte Gaben von 2,4,5-Trichlorphenol an Kaninchen per Magensonde (20 x in 28 Tagen) führten zu sehr leichten pathologischen Veränderungen in der Leber und Niere von solchen Tieren, welche 0,5 g/kg erhalten hatten. Verabreichte man Ratten unter denselben Bedingungen bis 1,0 g/kg Lebendgewicht, war ebenfalls außer einem leichten Anstieg des Nierengewichtes kein Befund festzustellen. Männlichen und weiblichen Ratten, denen man 28 Tage lang bis zu 1,0 g/kg Lebendgewicht oder 0,3 g/kg Lebendgewicht verabreichte, zeigten eine erhöhte Diurese. Das Durchschnittsgewicht der Tiere war leicht erniedrigt. Es waren nur wenige, dazu reversible Veränderungen an Lunge und Leber festzustellen. Auch in dem 78 Tage Langzeitversuch zeigte 2,4,5-Trichlorphenol eine schwache Toxizität.

## 2.2.3 Chlorferron

### 2.2.3.1 Struktur, chemische und physikalische Eigenschaften

Formel: $C_{10}H_7Cl\ O_3$




Chemische Namen:

a) 2-H-1- Benzopyran-2-one-3-chloro-7-hydroxy-4-methyl
b) 3-chloro-4-methyl-7-hydroxycoumarin
c) 3-chloro-4-methylumbeliferone
d) Chlorferron

Chlorferron bildet weiße Kristalle. Der Schmelzpunkt liegt bei 242 - 243°. Das Absorptionsmaximum liegt bei 332 nm und das Fluoreszenzmaximum bei 458 nm in Äthanollösung (BEILSTEIN, 1975; KANE et al., 1960).

### 2.2.3.2 Synthese

Die Substanz kann gewonnen werden, indem man zu 7-Hydroxy-4-methylcoumarin in Essigsäure Chlor in Tetrachlormethan gibt (BEILSTEIN, 1975).

### 2.2.3.3 Verwendung und Vorkommen

Industrie

Chlorferron wird kommerziell produziert und zur Herstellung von Insektiziden verwendet (KOTZLOVA & SHAKHOWA, 1971).

Metabolit

Chlorferron entsteht beim Abbau von O,O diethyl O- (3-chloro-4-methyl-2-oxo-2H-1 benzopyran-7-yl) phosphorothioat als Metabolit im Organismus. Diese Muttersubstanz ist als Coumaphos$^{R}$, Co Ral$^{R}$ und Bayer$^{R}$ 21/199 im Handel und findet als Insekten-Vertilgungsmittel seine Anwendung (MONROE & ROBBINS, 1959). Coumaphos$^{R}$ wird in steigendem Ausmaß in den USA, Kanada, aber auch in anderen Ländern angewendet. Es wirkt als Kontakt- und Systemgift auf Insekten und wird in Puderform auf Tiere aufgebracht, in Räumen frei versprüht, aber auch dem Futter direkt beigegeben. Chlorferron entsteht auch beim Abbau von Haloxon$^{R}$, einem Insektizid, das in ähnlicher Weise wie Coumaphos seine Wirkung entfaltet und auch dementsprechende Verwendungsarten findet (LEE, 1964).

### 2.2.3.4 Stoffwechsel und Ausscheidung

MONROE & ROBBINS(1959) stellten durch Versuche mit Fliegen fest, daß Chlorferron mit einer Konzentration von $6 \times 10^{-3}$ M 50 % der Cholinesterase hemmt. Die Muttersubstanz Coumaphos erzielt in Konzentrationen von $2,5 \times 10^{-5}$ M bereits die gleiche Wirkung.

VICKERY & ARTHUR (1960) benötigten bei ihren Versuchen an Insekten nur $2,33 \times 10^{-4}$ M Chlorferron um 50 % der Cholinesterase zu hemmen.

ALDRIDGE & REINER (1969) stellten an der Cholinesterase aus Rindererythrozyten fest, daß Chlorferron zu einer reversiblen Hemmung dieses Enzyms führt, wenn es in einer Mindeststärke von 15 µM auf die Cholinesterase einwirken kann. Nach PICKERING & MALONE (1967) wird Chlorferron als Konjungat im Urin und frei in den Fäces ausgeschieden. Es konnte auch im Gewebe von Hühnern nachgewiesen werden.

## 2.2.3.5 Toxikologie

### 2.2.3.5.1 Allgemeine Erkrankungen

Eine Vergiftungsgefahr durch Chlorferron besteht vor allen Dingen bei solchen Organismen, die mit Substanzen behandelt werden, welche dieses Coumarinderivat als Basissubstanz beinhalten. Durch Hydrolyse können dann die Substituenten abgespalten werden und Chlorferron wirksam werden lassen, wie es bei Coumaphos$^{R}$ und Haloxon$^{R}$ der Fall ist. Bis jetzt liegen keine Vergiftungsfälle beim Menschen vor, die nachweislich durch den Metabolit Chlorferron verursacht wurden. Beim Abbau dieser genannten Insektizide entstehen auch noch weitere Metaboliten: im Coumaphos-Stoffwechsel z.B. das Coroxon, welches nach ALDRIDGE & REINER (1969) einen weit stärkeren Cholinesterasehemmer als Chlorferron darstellt. Nach MONROE & ROBBINS (1959) wirkt es sogar stärker gegen die Cholinesterase als die Muttersubstanz Coumaphos. Mit 10 µg Chlorferron, appliziert pro Fliege, konnten MONROE & ROBBINS (1959) keine Giftwirkung erzielen. In der gleichen Versuchsreihe konnten für Coumaphos und Coroxon eine $LD_{50}$ von 0,107 µg ermittelt werden. VICKERY & ARTHUR (1960) gaben Chlorferron per os an Ratten. Sie besprühten auch Hausfliegen und Wanzen. Die $LD_{50}$ für Ratten belief sich auf mehr als 1000 mg Chlorferron pro kg Lebendgewicht. Für Fliegen und Wanzen war sie größer als 2000 mg/kg Lebendgewicht. Zum Vergleich betrug die $LD_{50}$ von Coumaphos für Ratten im geschilderten Versuch 20 mg/kg Lebendgewicht.

### 2.2.3.5.2 Erkrankungen am Auge

Es liegt keine Literatur darüber vor, ob durch Chlorferron Schäden an Augen verursacht worden sind. Nach einem unveröffentlichten Industriebericht führten i.p.-Injektionen von 12,5 mg Coumaphos an Ratten nach 60 Tagen zur Entwicklung einer Katarakt. Da die Metaboliten von Coumaphos noch nicht einzeln auf ihre Kataraktogenität überprüft wurden, kam auch Chlorferron als auslösende Noxe in Frage.

## 2.3 Die Einwirkungen der Umweltchemikalien auf die Linse

In den vorhergehenden Kapiteln konnte die Einwirkung der zu untersuchenden Substanzen Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron auf den Organismus dargestellt werden.

Am Institut für Experimentelle Ophthalmologie in Bonn wurden in-vitro-Versuche vorgenommen um zu testen, welchen Effekt die Substanzen Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron auf den Stoffwechsel von Rinderlinsen ausüben. Die Linsen wurden 42 Stunden in einem Nährmedium (TC 199) inkubiert, nachdem die Substanzen in einer Endmolarität von $10^{-3}$ M zugegeben worden waren. Die Meßdaten wurden statistisch ausgewertet.

Tab. 8: Einfluß von 2,4,5-Trichlorphenol, Pentachlorphenol und Chlorferron auf die Enzymaktivität in Rinderlinsen (HOCKWIN, 1977)
(Signifikante Unterschiede zu den Kontrollinsen sind unterstrichen, Enzymaktivitäten in mU/ggw, freie Adenonukleotide, Glykolyse-Zwischenprodukte in /uM/100 ggw)

| Konz. $10^{-3}$ M | | LDH | MDH | ALD | ATP | ADP | AMP | G-6-P | Glucose | F-6-P | Fructose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pentachlorphenol | - | 3993 | 3910 | 87,63 | 56,12 | 37,39 | 25,00 | 5,30 | 23,06 | 2,60 | 44,90 |
| | + | 2265 | 3229 | 55,21 | 19,05 | 12,83 | 24,97 | 4,31 | 85,65 | 2,66 | 28,06 |
| 2,4,5-Trichlorphenol | - | 938,45 | 539,3 | 34,43 | 50,98 | 26,44 | 5,78 | 5,22 | 20,33 | 2,36 | 40,09 |
| | + | 924,16 | 596,3 | 34,31 | 12,26 | 10,84 | 13,04 | 1,22 | 40,29 | 1,52 | 8,39 |
| Chlorferron | - | 5011 | 5810 | 142,4 | 50,23 | 28,78 | 18,23 | 4,25 | 25,51 | 5,11 | 34,59 |
| | + | 8260 | 7595 | 122,2 | 34,24 | 28,78 | 23,47 | 3,46 | 21,51 | 3,51 | 14,43 |

Verglichen mit der Kontrollgruppe wurden durch den Einfluß von Pentachlorphenol die Aktivitäten der LDH, MDH und ALD erniedrigt. Sehr stark verringerte sich auch die Konzentration der freien Adeninnucleotide, insbesondere von ATP und ADP. Der Glukosespiegel war stark erhöht und die Konzentration an Fruktose erniedrigt.

2,4,5-Trichlorphenol änderte nur die Aktivität der G-6-PDH. Es verringerte sich auch der Gehalt an ATP, ADP und Fruktose. Der Gehalt an Glukose war signifikant erhöht. Dabei konnte eine Schwellung der Linse festgestellt werden. Chlorferron erhöhte die Aktivitäten der LDH und MDH. Der Gehalt an ATP und AMP war unter der Einwirkung dieses Stoffes weniger stark erniedrigt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß der Kohlenhydratabbau und die Sicherung der Energiezufuhr der Linse durch die Einwirkung der drei Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron deutlich geschwächt wurden. Nach den Veränderungen der Enzymaktivitäten zu urteilen, war der Eiweißstoffwechsel weniger stark geschwächt (KORTE et al., 1976; HOCKWIN, 1977). Bei Versuchen mit Umweltchemikalien und Linseneiweiß wurde festgestellt, daß diese Substanzen in der Lage waren, Linseneiweiß zu fällen. Die wasserlöslichen Linseneiweiße lassen sich aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld in drei Gruppen einteilen, das $\alpha$-, $\beta$- und $\gamma$-Kristallin.

Nachdem man unterschiedliche Mengen der Umweltchemikalien zu hochkonzentrierten Linseneiweißhomogenaten gegeben hatte, konnte man folgendes beobachten: Durch 40 mg 2,4-Dichlorphenol/ml 20 % Linseneiweiß wurde fast alles $\alpha$-Kristallin ausgefällt. 20 mg 2,4,5-Trichlorphenol /ml 20% Linseneiweiß fällten das gesamte $\alpha$-Kristallin aus. Mit 16 mg Pentachlorphenol / mg 20 % Linseneiweiß konnte derselbe Effekt erzielt werden.

Daraus resultierte, daß bei steigender Zahl von Chlorsubstituenten am Phenolkern die Fällungsrate an wasserlöslichem Linsenprotein ansteigt. Dies wurde verständlich, wenn man berücksichtigt, daß der isoelektrische Punkt des $\alpha$-Kristallin, an dem es seine geringste Löslichkeit hat, bei

5,85 liegt und Phenole mit mehr als einem Chlorsubstituenten in Wasser pH-Werte unter 4,86 besitzen (ISMAIL et al. 1977 a ).

Durch in vitro-Versuche an Rinderlinsen konnte weiter nachgewiesen werden, daß die drei Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron in die Linse permeieren können. Dabei nimmt mit steigender Zahl der Chlorsubstituenten am Phenolring die Penetrationsrate in die Linse ab (ISMAIL et al., 1975). Diese in vitro gewonnenen Erkenntnisse konnten auch in vivo untermauert werden.

Mit $^{14}C$ markierte Umweltchemikalien wurden Kaninchen in die Augen getropft. Nach 30 und 60 Minuten wurden die 2,4,5-Trichlorphenol-behandelten Tiere getötet. Bei den mit Pentachlorphenol-behandelten Tieren geschah dies nur nach 30 Minuten. Aus den gemessenen Aktivitäten ließ sich die Konzentration der Umweltchemikalien-Rückstände in der Linse errechnen.

Tab.9 : Permeabilität von 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol in Kaninchenlinsen (ISMAIL, 1977b) (ug/g$C^{14}$-Chemikalie ; die Zahlen in Klammern geben die Konzentration in % der getropften Menge an)

| | 30' | 60' |
|---|---|---|
| 2,4,5 - Trichlorphenol | 0,08 (0,03) | 0,01 (0,003) |
| Pentachlorphenol | 0,03 (0,01) | |

Im einzelnen konnte durch diesen in vivo-Versuch nachgewiesen werden, daß chlorierte Phenole in 2-Methoxyäthanol, Tween 80 und Aquabidest gelöst und,in Tropfenform lokal am Auge angewendet, in die Linse eindringen und dort eine Wirkung entfalten können. Dabei wurden die in vitro-Versuche insofern bestätigt, als die höher chlorierten Phenole in einer geringeren Konzentration in die Linse eindrangen als die niedriger chlorierten. Pentachlorphenol hatte nach 30 Minuten in der Linse nur eine Konzentration von 0,01 % erreicht.

Bei allen untersuchten Substanzen war nach 30 Minuten eine höhere Konzentration in der Linse nachzuweisen als nach 60 Minuten, was bedeuten würde, daß die Konzentration z.B. von Pentachlorphenol bereits nach einer Stunde unter 0,01 % abgesunken ist (ISMAIL et al., 1977 b).

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Versuchstiere, Tierhaltung

Für den Versuch wurden 51 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen) verwendet. Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere betrug bei Versuchsbeginn 90,5 g, das Tieralter lag bei etwa 4-6 Wochen.

Je zwei Tiere wurden in einem Makrolonkäfig mit Sägespaneinstreu gehalten. Die Tiere konnten beliebige Mengen von pelletiertem Altromin-R Standardfutter aus einem Futtertrog, der in den Käfig eingelassen war, zu sich nehmen.

## 3.2 Umweltchemikalien und Lösungsmittel

Chlorferron:

Lieferant: Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung, München.

Produzent: Bayer AG, Leverkusen.

Reinheitsgrad: 98 % (Gaschromatographisch)

2,4,5 - Trichlorphenol:

Lieferant: Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung, München.

Produzent: Fa. Merck - Schuchard

Reinheitsgrad: 98 % (alkalimetrisch)

Pentachlorphenol:

Lieferant: Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München.

Produzent: Fa. Merck - Schuchard

Reinheitsgrad: 98% (alkalimetrisch)

Lösungsmittel:

Methoxyäthanol = Aethylenglykolmonomethylaether

Produzent: Fluka AG
Reinheitsgrad: 99,5 %

Tween 80 = Polyäthylenglykolsorbitoleat
Produzent: Merck - Schuchardt

Aquabidest

### 3.3 Herstellung der Augentropfen

Chlorferronlösung:

Zu 60 mg Chlorferron wurden 2,4 ml Methoxyäthanol pipettiert. Chlorferron ist in Methoxyäthanol schlecht löslich. Die Mischung mußte daher 3-5 Minuten geschüttelt werden. Dann wurden 2,1 ml Tween 80 als Emulgator hinzugefügt, kurz umgeschüttelt und die endgültige Applikationsform hergestellt, indem man kurz vor der Behandlung 4,5 ml Aquabidest zupipettierte und kräftig aufschüttelte.

2,4,5 - Trichlorphenollösung:

Zu 180 mg 2,4,5-Trichlorphenol wurden 2,4 ml Methoxyäthanol pipettiert. Bei kräftigem Aufschütteln löste sich die gesamte Stoffmenge sehr schnell. Zugabe von 2,1 ml Tween 80, und kurz vor der Behandlung 4,5 ml Aquabidest, ergaben nach kräftigem Aufschütteln die zu applizierende Lösung.

Pentachlorphenollösung:

135 mg Pentachlorphenol wurden unter kurzem kräftigen Aufschütteln in 2,4 ml Methoxyäthanol gelöst. Dann wurden 2,1 ml Tween 80 und kurz vor der Behandlung 4,5 ml Aquabidest hinzupipetiert.

Lösungsmittel:

Zur Herstellung einer substanzfreien Lösung wurden Methoxyäthanol, Tween 80 und Aquabidest im gleichen Verhältnis gemischt.

Die Lösungen wurden alle zwei Tage vollständig neu angesetzt und in gläserne Tropf-Fläschchen eingefüllt. Sie konnten so genau dosiert verabreicht werden.

Konzentrationen im Lösungsmittel:

| | |
|---|---|
| Chlorferron | 0,67 g/100 ml |
| 2,4,5-Trichlorphenol | 2,00 g/100 ml |
| Pentachlorphenol | 1,50 g/100 ml |

### 3.4 Versuchsaufbau und Voruntersuchung

Ziel des Versuchs war es festzustellen, ob sich mit den Umweltchemikalien Chlorferron, 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol bei lokaler Anwendung am Auge eine Katarakt bei Ratten erzeugen läßt.

Um sicherzustellen, daß nur augengesunde Tiere in den Hauptversuch übernommen wurden, wurden alle angelieferten Tiere zunächst am Spaltlampenmikroskop voruntersucht. Für den Versuch wurden 5 mit je 10 Tieren besetzte Versuchsgruppen verwendet. Von diesen wurden 3 Gruppen mit den 3 Testsubstanzen behandelt. Eine Gruppe wurde lediglich mit dem Lösungsmittel behandelt. Die 5. Gruppe blieb unbehandelt.

Tab.10 : Versuchsaufbau

| Behandlung | Index | Kontrolle | Chlor-ferron | Tri-chlor-phenol | Penta-chlor-phenol | Lösungs-mittel |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gruppe | i | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Tier | i.j | 0.1 | 1.1 | 2.1 | 3.1 | 4.1 |
| | | 0.2 | 1.2 | 2.2 | 3.2 | 4.2 |
| | | 0.3 | 1.3 | 2.3 | 3.3 | 4.3 |
| | | 0.4 | 1.4 | 2.4 | 3.4 | 4.4 |
| | | 0.5 | 1.5 | 2.5 | 3.5 | 4.5 |
| | | 0.6 | 1.6 | 2.6 | 3.6 | 4.6 |
| | | 0.7 | 1.7 | 2.7 | 3.7 | 4.7 |
| | | 0.8 | 1.8 | 2.8 | 3.8 | 4.8 |
| | | 0.9 | 1.9 | 2.9 | 3.9 | 4.9 |
| | | 0.10 | 1.10 | 2.10 | 3.10 | 4.10 |

## 3.5 Versuchsdurchführung

### 3.5.1 Applikation der Augentropfen

Wie bereits im Einführungsteil erwähnt, ist es nicht gleichgültig, auf welche Weise eine umweltschädliche Substanz in den Organismus gelangt. Im vorliegenden Versuch wurde geprüft, ob eine lokale Applikation der Substanzen auf das Auge kataraktogene Folgen hat.

Zur Applikation wurden die Ratten mit der rechten Hand gehalten, ihr Kopf auf die Seitenfläche des Mittelfingers gedrückt, und mit Zeigefinger und Daumen die Augenlider gespreizt. Aus dem Tropf-Fläschchen wurde dann ein Tropfen auf die Bulbusoberfläche appliziert, der sich dort sofort gleichmäßig bis in den Bindehautsack ausbreitete. Dabei muß vermerkt werden, daß besonders die mit Pentachlorphenol behandelten Tiere nach der ersten Applikation bereits starke Abwehrbewegungen durchführten und damit eine kontrollierte Behandlung erschwerten. Die Behandlung erfolgte beidseits 3mal täglich. Die Dauer des Versuchs betrug 140 Tage. Bei einem Tropfenvolumen von ca 17 µl gelangten bei jeder Behandlung 0,11 mg Chlorferron, 0,25 mg Pentachlorphenol und 0,34 mg Trichlorphenol auf die Augenoberfläche. Unter der Voraussetzung einer vollständigen Resorption würde sich dabei eine Tagesdosis von 0,34 mg für Chlorferron, von 0,75 mg für Pentachlorphenol und von 1,00 mg für Trichlorphenol ergeben. Allerdings ist zu bedenken, daß ein großer Teil des Tropfens beim ersten Lidschluß von der Augenoberfläche abgestreift wird und nur ein wesentlich kleinerer Substanzanteil tatsächlich resorbiert wird.

### 3.5.2 Spaltlampenuntersuchung

Mit einem Spaltlampenmikroskop der Fa. Zeiss, Oberkochen, wurden die Linsen aller Versuchstiere einmal pro Woche untersucht. Eine Viertelstunde vor der Untersuchung wurden die Pupillen der Tiere mit 1%-igen Atropin-Augentropfen erweitert.

Die Linsenveränderungen konnten mittels eines zusätzlichen monokularen Einblickstutzens am Zeiss-Spaltlampenmikroskop von einem zweiten Beobachter mitbeurteilt werden. Die Linsen der Tiere wurden im fokalen und regredienten Licht betrachtet und die gewonnene Information sofort auf vorgedruckten Bögen zeichnerisch in drei Ebenen festgehalten.

### 3.5.3 Körpergewichte

Die Körpergewichte wurden einmal pro Woche bestimmt.

### 3.5.4 Linsenpräparation

Die Behandlungs-und Beobachtungsdauer betrug 140 Tage. 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurden die Tiere in Äther-Narkose getötet und die Augen enucleiert. Die Präparation der Linsen erfolgte durch Einschnitt am hinteren Bulbuspol, Aufreißen der Bulbushüllen mit Pinzetten, Entnahme der Linsen und vorsichtiges Abstreifen auf Fließpapier, um anhängende Reste des Ciliarkörpers und des Glaskörpers zu entfernen. Die Präparation erfolgte unter einer Op-Leuchte bei Lupenbetrachtung.

Nur Linsen, die bei der Präparation unverletzt geblieben waren, wurden zur Weiterverarbeitung verwendet. Nach der Linsenpräparation wurden auch die Hornhäute vollständig excidiert. Linsen und Hornhäute wurden zum Wirkstoffnachweis biochemisch aufgearbeitet. Die zur Verfügung stehende Meßmethode machte aus Gründen der Nachweisgrenze das Poolen von jeweils 10 Linsen bzw. 20 Hornhäuten notwendig. Aus diesem Grunde standen für die Nachweismethoden je zwei Linsenhomogenate und je ein Hornhauthomogenat pro Versuchsgruppe zur Verfügung. Die Frischgewichte der Linsen und Hornhäute wurden mit einer Analysenwaage (Mettler; 0,1 mg) bestimmt. Bis zur Weiterverarbeitung am nächsten Tag wurden sie bei -24°C eingefroren.

### 3.5.5 Homogenisieren und Extrahieren

Nach Auftauen über eine Viertelstunde wurden die Linsen in jeweils 2 ml Aquabidest homogenisiert. Sodann wurde mit 2 ml Hexan extrahiert.Die gepoolten Hornhäute einer Gruppe wurden jeweils in 1,5 ml Aquabidest homogenisiert und ebenfalls mit 2 ml Hexan extrahiert. Vom Überstand jeder Probe wurde für die Gas-Chromatographie vorgelegt.

### 3.5.6 Gaschromatographische Analyse

Es wurde ein Gaschromatograph (Packard 7600/7800) mit Flammenionisationsdetektor benutzt. Die Säulenlänge betrug 1,5 m, der Durchmesser 0,5 cm. Als Füllstoff wurde 5% Silikon SE 52 Chromosorb W 80/100 mesh verwendet. Es wurde bei folgenden Temperaturen gearbeitet: Trichlorphenol $175^{o}$, Pentachlorphenol $230^{o}$, Chlorferron $230^{o}$. Als Träger dienten 40 ml Argon/min. Die Detektorflamme wurde mit 40 ml/$H_2$/min. und 250 ml Luft/min. beschickt. Die Beschleunigungsspannung wurde auf 150 Volt eingestellt und die Verstärkerempfindlichkeit auf $3 \times 10^{-10}$. Die Nachweisgrenze lag bei der oben angegebenen Einstellung bei 0,02 mg - 0,04 mg Substanz in 100 ml Ansatz.

## 3.6 Auswertung der Meßdaten

### 3.6.1 Morphologische Befunde

Die Untersuchungsdaten aus der Spaltlampenuntersuchung lagen als Zeichnungen und Beschreibungen vor. Da nur in zwei Versuchsgruppen je ein Versuchstier eine Katarakt entwickelte, erübrigte sich eine statistische Bearbeitung.

### 3.6.2 Körpergewichte

Verzeichnis der benutzten Abkürzungen

| | |
|---|---|
| $n$ | Gesamtzahl aller Tiere |
| $n_i$ | Gesamtzahl der Tiere in einer Gruppe |
| $j$ | Nummer des Tieres in einer bestimmten Gruppe |
| $i_H$ | Gesamtzahl der Gruppen |
| $i$ | Nummer einer bestimmten Gruppe |
| $\bar{x}_i$ | Mittelwert einer bestimmten Gruppe |
| $\bar{x}$ | Mittelwert über alle Gruppen-Mittelwerte |
| $x_{ij}$ | Wert eines bestimmten Einzeltieres (j) in einer bestimmten Gruppe (i) |

Hier war es erforderlich, zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchsverlaufs fünf Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen. Hierfür ist die Varianzanalyse das geeignete Verfahren.

Die Varianzanalyse ist eine Methode, mit der sich unter Verwendung einer Wahrscheinlichkeitsfunktion prüfen läßt, ob Ergebnisse aus verschieden behandelten Versuchsgruppen zufällig voneinander abweichen, oder ob ein Behandlungseinfluß für die Gruppenunterschiede verantwortlich ist. Voraussetzung ist, daß man Meßdaten als Stichprobenwerte einer zufälligen Stichprobe aus einer bestimmten Grundgesamtheit ansieht, um sie als Stichprobenpunkte behandeln zu können. Bei fünf Versuchsgruppen würden sich im vorliegenden Fall also fünf Grundgesamtheiten ergeben, die durch ihre Mittelwerte $\mu_0$, $\mu_1$, $\mu_2$, $\mu_3$, $\mu_4$ charakterisiert sind. Die Stichprobenmittelwerte bezeichnet man im Gegensatz dazu als $\bar{x}_0$, $\bar{x}_1$, $\bar{x}_2$, $\bar{x}_3$, $\bar{x}_4$. Wir stellen nun die Hypothese auf, daß sich die fünf Grundgesamtheiten nicht voneinander unterscheiden, so als gäbe es nur eine Grundgesamtheit u:

$$\mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu$$

Diese Hypothese bezeichnen wir als 0-Hypothese ($H_0$). Trifft sie zu, sind die beobachteten Unterschiede zwischen den Stichproben

zufällige Abweichungen, trifft sie nicht zu, muß ein Einfluß der verschiedenen Behandlungen angenommen werden.

Die Frage lautet nun, ob das Bild der Stichproben diese O-Hypothese stützt oder nicht. Im vorliegenden Versuch bedeutet dies: Gibt es einen Einfluß der Behandlung auf die Gewichtszunahme der Tiere oder nicht. Auch ohne Behandlung variiert die Gewichtszunahme von Tier zu Tier. Dies ist die Folge verschiedener Zufallseinflüsse. Zweck dieses Tests ist es nun, diese vielfältigen Zufallseinflüsse auf das Gewicht der Tiere von solchen Einflüssen zu trennen, die durch die Behandlung verursacht wurden.

Zu diesem Zweck wird die Summe der Quadrate der Abweichungen der Stichprobenwerte vom Gesamtmittelwert $\sum\sum (x_{ij} - \bar{x})^2$ derart zerlegt, daß man die Summen von Bestandteilen erhält, deren jede eine bestimmte Variationsursache enthält. Es läßt sich zeigen, daß man den obengenannten Term folgendermaßen aufgliedern kann:

$$\underset{(a)}{\sum\sum (x_{ij} - \bar{x})^2} = \underset{(b)}{\sum\sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2} + \underset{(c)}{\sum\sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2}$$

Term (b) stellt die Summe der Quadrate der Abweichungen der Stichprobeneinzelwerte vom Stichprobenmittelwert dar, wird also von der Streuung innerhalb der Gruppen beeinflußt und gibt zufällige Abweichungen vom Mittelwert wieder. Term (c) stellt die Summe der Quadrate der Abweichungen der Stichprobenmittelwerte vom Mittelwert des Gesamtversuches dar. Er wird von den Unterschieden zwischen den Gruppen beeinflußt und repräsentiert damit nicht die zufälligen, sondern die auf den Behandlungseinfluß zurückzuführenden Abweichungen zwischen den einzelnen Gruppen.

Mit der O-Hypothese haben wir festgelegt, daß es eine Grund-gesamtheit u gibt, die gleich den einzelnen Grundgesamtheiten $u_0$, $u_1$, $u_2$, $u_3$, $u_4$ ist. Wir berechnen nun den unverzerrten Schätzwert für die Varianz dieser uns bekannten Grundgesamtheit, indem wir die verschiedenen Stichproben-Varianzen zusammenfassen. Man erhält dann für die Varianz der hypothetischen Grundgesamtheit:

$$(d)\quad G^2 = \frac{1}{n - i_H} \sum_{i=o}^{i_H} \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$$

Auf einem anderen Rechenweg erhalten wir für dieselbe Varianz:

$$(e)\quad G^2 = \frac{1}{i_H - 1} \sum_{i=o}^{i_H} n_i \, (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2$$

Wie man erkennen kann, ist der Term $(x_{ij} - \bar{x}_i)^2$ aus (d) gleich dem Term (b). Ebenso ist der Term $(\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2$ aus (e) gleich dem Term (c).

Wie bereits erklärt wurde, ist die nach (d) berechnete Streuung ein Maß für die Streuung der Einzelwerte vom jeweiligen Gruppenmittel, während die nach (e) berechnete Streuung auf Abweichungen der Gruppenmittel vom Gesamtmittel zurückzuführen ist.

Die jeweils im Nenner befindlichen Terme $n - i_H$ und $i_H - 1$ werden als Freiheitsgrade bezeichnet und entsprechen der Anzahl der im vorliegenden Ausdruck jeweils frei wählbaren Werte.

Trifft nun die Nullhypothese zu, dann müßten auch die Mittelwerte $\bar{x}_i$ der Stichproben untereinander und gegenüber dem Gesamtmittelwert $\bar{\bar{x}}$ annähernd gleich sein. Trifft die 0-Hypothese aber nicht zu, so werden sich Mittelwerte aus den einzelnen Gruppen voneinander und vom Gesamtmittelwert $\bar{\bar{x}}$ deutlich unterscheiden. Da in Term (c) die Abweichungen der Gruppenmittelwerte $\bar{x}_i$ vom Gesamtmittelwert $\bar{\bar{x}}$ als Differenz dargestellt werden, wird das Ergebnis dieses Terms bei nicht zutreffender 0-Hypothese größer werden. Der Term (b) wird dagegen unbeeinflußt bleiben, da sich $(x_{ij} - \bar{x}_i)^2$ nur auf Abweichungen innerhalb einer Gruppe beziehen. Da die Formel (e) den Term (c) enthält, dürfte also bei nicht zutreffender 0-Hypothese die hieraus errechnete Varianz größer werden, während die aus Formel (d) errechnete Varianz sich nicht verändert, weil sie Term (b) enthält. Aus dem Vergleich der Varianz $G^2$ aus (e) und der Varianz $G^2$ aus (d) kann man also erkennen, ob die 0-Hypothese zutrifft oder nicht. Zu diesem Zweck bildet man den Quotienten F.

$$\hat{F} = \frac{G^2_{(e)}}{G^2_{(d)}} \frac{\frac{1}{i_H - 1} \sum_{i=o}^{i_H} n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{\frac{1}{n - i_H} \sum_{i=o}^{i_H} \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - x_i)^2} \qquad (f)$$

$$\hat{F} = \frac{\text{Zwischen den Gruppen (Behandlungseinwirkungen)}}{\text{Innerhalb der Gruppen (Zufällige Schwankungen von Tier zu Tier)}}$$

Trifft die 0-Hypothese zu, dann liegt $\hat{F}$ bei 1. Trifft die 0-Hypothese nicht zu, dann wird der Zähler größer und $\hat{F}$ nimmt Werte an, die deutlich größer als 1 sind. Der kritische Wert über 1, der von $\hat{F}$ erreicht werden muß, um- mit einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit - die Nullhypothese verwerfen zu können, ergibt sich aus der theoretischen F-Verteilung.

Die F-Verteilung liegt für verschiedene Freiheitsgrade und Irrtumswahrscheinlichkeiten tabelliert vor. Für die eigenen Versuche wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von = 0,05 verlangt.

Eine detaillierte Darstellung der varianzanalytischen Methoden finden sich bei YAMANE (1976) und WINER (1970).

Die Varianzanalyse macht nur eine Aussage über den Versuch als Ganzes. Die 0-Hypothese nimmt an, daß alle Stichproben aus einer gemeinsamen Grundgesamtheit stammen. Dementsprechend bedeutet eine Ablehnung der 0-Hypothese, daß nicht alle Gruppen aus einer gemeinsamen Grundgesamtheit kommen. Die Varianzanalyse gibt jedoch keine Auskunft darüber, hinsichtlich welcher Gruppen im Einzelnen Unterschiede bestehen. Um das zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Untersuchung immer dann individuelle Mittelwertsvergleiche an die Varianzanalyse angeschlossen, wenn diese eine Ablehnung der 0-Hypothese erlaubte.

Für Mittelwertsvergleiche eignet sich der t-Test, dessen Prüfgröße $\hat{t}$ sich für den Vergleich zweier Gruppen bei einem 2-Stichprobenexperiment wie folgt berechnet:

$$(g) \qquad \hat{t} = \frac{\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \cdot s^2}}$$

Dabei ist $s^2$ die zusammengefaßte Varianz aus beiden Stichproben. Die Prüfgröße muß dann mit der theoretischen t-Verteilung verglichen werden, die für verschiedene Freiheitsgrade $(n_1 + n_2 - 2)$ und Irrtumswahrscheinlichkeiten tabelliert vorliegt.

Für den Vergleich individueller Mittelwerte nach Varianzanalyse ist in Formel (g) als Varianz $s^2$ die Varianz innerhalb der Stichproben einzusetzen, da hier ja die Streuung innerhalb aller Stichproben des Experiments den Versuchsfehler darstellt.

Für die vorliegende Untersuchung sollten die Körpergewichte der 4 behandelten Gruppen 1-4 mit der Kontrollgruppe 0 verglichen werden. DUNNETT (1955, 1965) hat gezeigt, daß bei diesem Vorgehen allerdings die t-Verteilung nicht angewendet werden kann, da sonst die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Ordnung (irrtümliche Ablehnung der 0-Hypothese) bei den Extremwerten unter den Gruppenmittelwerten erheblich zunimmt. Daher wurden die ermittelten $\hat{t}$ - Werte mit dem von DUNNETT (1955) tabellierten Wert für $t_{corr.}$ verglichen.

### 3.6.3 Linsenfrischgewichte

Die bei Versuchsende ermittelten Linsenfrischgewichte wurden ebenfalls einer Varianzanalyse mit anschließendem DUNNETT-Test unterworfen. Allerdings standen hier nicht die Originalwerte für Einzellinsen, sondern die aus je zwei Pools pro Gruppe errechneten Werte zur Verfügung (vgl. 4.3) .

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Morphologische Befunde

Es war das Ziel der Untersuchung, mit dem Spaltlampenmikroskop festzustellen, ob bei den mit den drei Umweltchemikalien

| | |
|---|---|
| Chlorferron | Gruppe 1 |
| Trichlorphenol | Gruppe 2 |
| Pentachlorphenol | Gruppe 3 |

behandelten Tieren Linsentrübungen entstehen. Da die Substanzen in einem Lösungsmittelgemisch von Methoxyäthanol, Tween-80 und Wasser verabreicht wurden, diente zum Vergleich - neben einer ganz unbehandelten Kontrollgruppe 0 - auch eine nur mit dem Lösungsmittel behandelte Gruppe 4.

### 4.1.1 Gruppe 0 (Kontrolle)

Im gesamten Versuchsverlauf über 140 Tage traten in dieser Gruppe keine pathologischen Linsenveränderungen auf. Einzelne Tiere ließen zarte Trübungen im Bereich der Nähte des Fetalkerns erkennen. Diese Trübungen sind angeboren und wahrscheinlich vererbt. Sie treten häufig bei Laborratten auf, schreiten nicht fort und haben keine klinische Bedeutung. Sie wurden auch bei Tieren der behandelten Gruppen gesehen. Hierauf wird jedoch nicht weiter eingegangen werden.

Zum Teil wurden auch Hornhautveränderungen gesehen. So hatten die meisten Tiere am 66. Versuchstag eine leichte Stippung des zentralen Hornhautepithels erkennen lassen. Auch an den übrigen Terminen waren einzelne Tiere mit einer solchen zentralen Hornhautstippung zu erkennen.

### 4.1.2 Gruppe 1 (Chlorferron)

Diese Gruppe ließ keine pathologischen Linsenveränderungen erkennen. An der Hornhaut waren die in Gruppe 0 gesehenen Veränderungen zu erkennen, allerdings traten sie früher auf und waren etwas deutlicher ausgeprägt als bei den Kontrolltieren.

### 4.1.3 Gruppe 2 (Trichlorphenol)

In der mit Trichlorphenol behandelten Gruppe entwickelte ein Tier (26) eine Linsentrübung.

Das Tier, das bei der Voruntersuchung keinen pathologischen Augenbefund erkennen ließ, hatte 3 Wochen nach Versuchsbeginn eine Katarakt entwickelt. Die Trübung fand sich am linken Auge temporal unten im Äquatorbereich und erstreckte sich von hier in die vordere und hintere Linsenrinde. Hinter der Trübung fand sich im peripheren Glaskörper der Rest einer Blutung. Aus diesem Grunde ist anzunehmen, daß die Entwicklung dieser Katarakt nicht die Folge einer Einwirkung von Trichlorphenol auf die Linse ist. Vielmehr muß angenommen werden, daß es sich um eine sogenannte Cataracta complicata nach Glaskörperblutung handelt. Im weiteren Verlauf wurde die Trübung im Zusammenhang mit dem weiteren appositionellen Wachstum der Linse in die tieferen Schichten der Linsenrinde verlagert. Nach 6 Wochen fanden sich auch in den übrigen peripheren Anteilen der Linsenrinde feine, subcapsuläre Trübungen, die nach 8 Wochen weiter zugenommen hatten. Nach 10 Wochen waren diese subcapsulären Trübungen ebenfalls ins Linseninnere gerückt und nicht mehr so deutlich zu erkennen. Sie befanden sich jetzt im Bereich einer zart getrübten, konzentrischen Schicht der tieferen Rinde. Für den Rest der Beobachtungszeit blieb dann der Befund in etwa stationär (Abb. 3 a-d).

Alle anderen Tiere dieser Gruppe ließen keine pathologischen Linsenveränderungen erkennen.

Die Befunde an der Hornhaut entsprachen in der Ausprägung den in Gruppe 1 gesehenen Befunden.

### 4.1.4 Gruppe 3 (Pentachlorphenol)

Am 14. Versuchstag wurden bei Tier 31 Anzeichen einer beginnenden Linsentrübung am linken Auge erkennbar. Neben einer Betonung der Kern-Rinden-Grenze fand sich im Äquatorbereich am Ansatz des temporal unteren Astes der Art. hyaloida eine größere Vakuole und zahlreiche feine, streifige Trübungen.

Nach 4 Wochen entwickelte sich die Linsentrübung bei Tier 31 zurück, so daß in einer tieferen Rindenschicht nur noch feine, punktförmige bis streifige Trübungen beobachtet werden konnten. Es ist nicht anzunehmen, daß diese diskrete, umschriebene und reversible Linsenveränderung in einem ursächlichen Zusammenhang mit Pentachlorphenol steht. Alle anderen Versuchstiere zeigten im Verlauf der Beobachtungszeit keine pathologischen Linsenveränderungen.

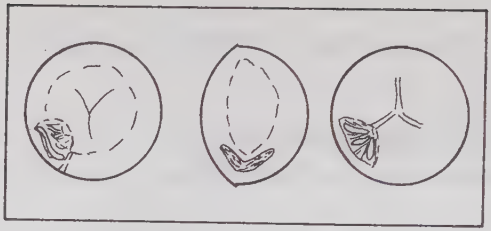
An den Hornhäuten wurden wiederum feine Stippungen der Epithelmitte registriert. Hinsichtlich des Schweregrades entsprachen diese den Veränderungen in den Gruppen 1 und 2.

### 4.1.5 Gruppe 4 (Lösungsmittel)

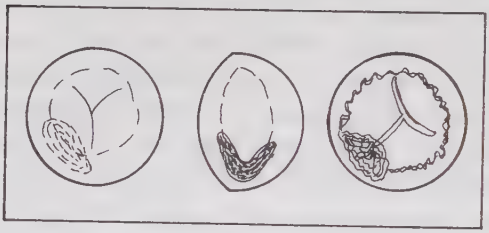
In der lediglich mit dem Lösungsmittel behandelten Vergleichsgruppe wurden keine pathologischen Linsenveränderungen gesehen.

Die Hornhautbefunde unterschieden sich nicht wesentlich von den Befunden, die in den substanzbehandelten Gruppen 1-3 erhoben wurden.

a: 3. Woche



b: 6. Woche



c: 8. Woche

d: 10. Woche

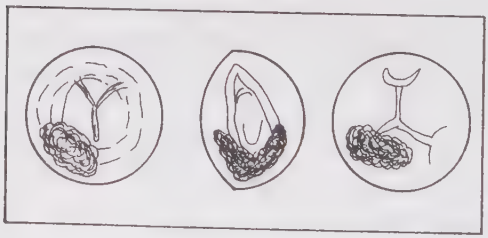
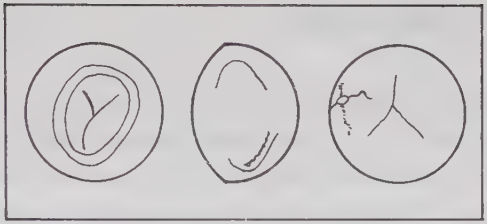


Abb. 3 : Veränderungen der linken Linse bei Tier 26 (Gruppe 2; Trichlorphenol-behandelt) 3, 6, 8 und 10 Wochen nach Versuchsbeginn. Vordere Rinde (links), optischer Schnitt (Mitte) und hinterer Schnitt (rechts)

a: 2. Woche



b: 4. Woche

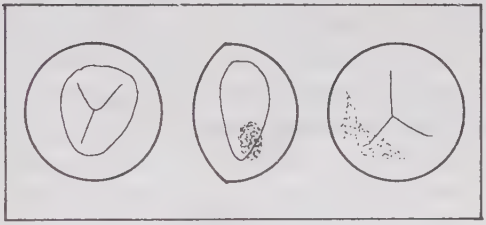


Abb. 4: Veränderungen der linken Linse bei Tier 31 (Gruppe 3, Pentachlorphenol-behandelt)2 und 4 Wochen nach Versuchsbeginn; vordere Rinde (links), opt. Schnitt (Mitte) und hintere Rinde (rechts)

## 4.2 Körpergewichte

Die Daten über den Verlauf der Körpergewichte wurden wöchentlich erhoben. Es sollte damit festgestellt werden, ob gegenüber der Kontrollgruppe bei den mit Lösungsmittel oder Umweltchemikalien behandelten Tieren eine Veränderung in der Gewichtszunahme auftritt. An jedem Termin wurden für alle Versuchsgruppen Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt (Tab.11). Eine graphische Darstellung findet sich auf Abb. 5.

Die Tiere nahmen bis zur 4. Woche alle im selben Ausmaß an Gewicht zu. Von da ab zeigten die Kontrolltiere den größten Gewichtszuwachs, während die Lösungsmittel-behandelten Tiere den geringsten Gewichtszuwachs verzeichneten.

Am 1., 42., 91. und 140. Versuchstag wurden die Körpergewichte mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse und anschließendem DUNNET-t-Test statistisch analysiert. Die Auswertung zeigt, daß zu Versuchsbeginn keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden. Im weiteren Verlauf waren jedoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen (Tab.12).

Der DUNNET-t-Test deckte auf, daß an allen untersuchten Terminen der Unterschied der lediglich mit dem Lösungsmittel behandelten Versuchsgruppe signifikant war, während der weniger große Unterschied der drei anderen mit den Testsubstanzen behandelten Gruppen am 91. Tag auch signifikant wurde. Gegen Versuchsende verwischte sich der Unterschied zwischen den Gruppen wieder (vgl.Tab.13), so daß jetzt nur noch Gruppe 1 (Chlorferron) und 4 (Lösungsmittel) signifikant von der Kontrolle abwichen.

In Tab.14 sind die prozentualen Abweichungen des mittleren Körpergewichtes in den behandelten Gruppen von der Kontrollgruppe zusammengestellt. Es läßt sich erkennen, daß die Abweichung in Gruppe 4 zwischen 12 und 15% betrug, während die Unterschiede in den anderen Gruppen deutlich geringer waren.

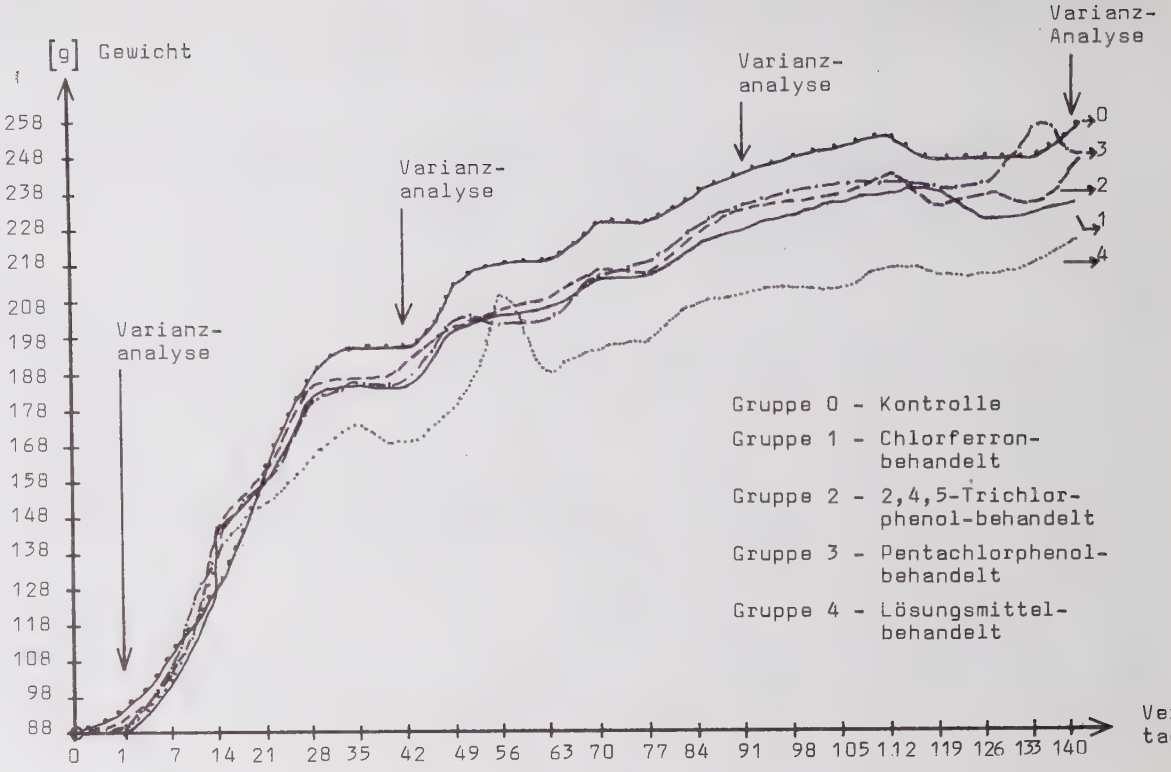



Abb. 5 : Verlauf der mittleren Körpergewichte in den einzelnen Gruppen und Zeitpunkte der statistischen Auswertung

Tab. 11 : Körpergewichte in den 5 Versuchsgruppen vom 1. - 140. Tag (Mittelwert und Standardabweichungen)

| | Gruppen | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| | $\bar{x}$ | s | $\bar{x}$ | s | $\bar{x}$ | s | $\bar{x}$ | s | $\bar{x}$ | s |
| 1 | 94,2 | 7,49 | 88,0 | 4,87 | 91,6 | 6,73 | 90,7 | 4,32 | 90,3 | 7,08 |
| 7 | 110,6 | 5,57 | 101,1 | 5,78 | 104,9 | 6,03 | 105,6 | 6,94 | 102,3 | 7,45 |
| 14 | 116,9 | 11,55 | 146,6 | 6,58 | 142,9 | 10,30 | 140,9 | 10,38 | 135,3 | 7,24 |
| 21 | 162,9 | 6,27 | 157,5 | 6,11 | 160,04 | 9,60 | 162,0 | 11,35 | 151,3 | 8,34 |
| 28 | 186,9 | 9,21 | 180,7 | 8,05 | 185,2 | 11,39 | 179,2 | 11,13 | 164,5 | 16,24 |
| 35 | 194,0 | 11,80 | 184,4 | 10,90 | 186,6 | 16,25 | 186,3 | 14,93 | 173,6 | 6,51 |
| 42 | 194,4 | 11,51 | 183,3 | 11,82 | 190,9 | 15,09 | 185,4 | 14,86 | 168,1 | 9,45 |
| 49 | 211,9 | 11,06 | 194,8 | 11,63 | 201,5 | 16,61 | 201,6 | 16,28 | 178,6 | 20,84 |
| 56 | 218,0 | 10,49 | 203,9 | 10,82 | 202,6 | 19,51 | 206,3 | 13,82 | 209,5 | 21,94 |
| 63 | 218,9 | 8,41 | 206,9 | 11,67 | 209,0 | 17,39 | 207,5 | 13,82 | 188,6 | 7,21 |
| 70 | 229,2 | 10,79 | 213,2 | 13,60 | 216,0 | 20,49 | 214,9 | 16,12 | 194,5 | 10,26 |
| 77 | 229,2 | 10,89 | 214,6 | 12,58 | 216,1 | 19,64 | 218,1 | 14,83 | 196,7 | 8,67 |
| 81 | 236,9 | 11,37 | 222,8 | 10,76 | 226,1 | 19,77 | 227,0 | 17,20 | 207,4 | 7,24 |
| 91 | 243,6 | 11,67 | 227,7 | 10,59 | 233,4 | 13,35 | 235,9 | 17,22 | 209,8 | 8,41 |
| 98 | 247,3 | 12,12 | 231,2 | 10,19 | 235,4 | 13,19 | 238,2 | 16,91 | 212,4 | 7,84 |
| 105 | 250,7 | 10,73 | 235,5 | 9,86 | 237,2 | 10,97 | 240,5 | 16,47 | 211,6 | 11,47 |
| 112 | 253,3 | 12,10 | 238,5 | 13,65 | 242,6 | 18,56 | 241,8 | 16,86 | 217,3 | 7,84 |
| 119 | 246,6 | 14,74 | 258,5 | 28,86 | 235,9 | 20,37 | 239,9 | 16,14 | 216,2 | 9,03 |
| 126 | 247,6 | 20,45 | 230,4 | 14,84 | 237,5 | 21,17 | 240,4 | 16,65 | 215,3 | 11,94 |
| 133 | 247,1 | 16,50 | 231,1 | 22,61 | 234,7 | 22,34 | 256,5 | 23,74 | 218,6 | 15,19 |
| 140 | 254,8 | 16,40 | 233,7 | 22,37 | 244,5 | 23,48 | 250,9 | 20,89 | 224,3 | 11,37 |

Tab. 12 : Varianzanalyse der Körpergewichte in den 5 Versuchsgruppen an 4 Zeitpunkten des Versuches

* $F(4,45; \alpha = 0,05) = 2,58$; $F(4,45; \alpha = 0,01) = 3,78$

| | Var.Urs. | S.A.Q. | F.G. | M.A.Q. | $\hat{F}$ | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A: 1.Tag | zwischen | 201,7 | 4 | 50,43 | 1,3 | - |
| | innerhalb | 1748,2 | 45 | 38,83 | | |
| | total | 1949,9 | 49 | | | |
| B: 42.Tag | zwischen | 4101,5 | 4 | 1025,4 | 6,33 | <0,01 |
| | innerhalb | 7290,2 | 45 | 162,0 | | |
| | total | 11391,7 | 49 | | | |
| C: 91.Tag | zwischen | 6589,7 | 4 | 1647,4 | 8,34 | <0,01 |
| | innerhalb | 8887,0 | 45 | 197,5 | | |
| | total | 15476,7 | 49 | | | |
| D:140.Tag | zwischen | 6001,5 | 4 | 1500,4 | 3,92 | <0,01 |
| | innerhalb | 16826,8 | 44 | 382,4 | | |
| | total | 22828,3 | 48 | | | |

Tab. 13 : DUNNET'S-t-Test zum Vergleich der Körpergewichte der 4 behandelten Gruppen (1 - 4) mit der Kontrollgruppe (0)

* $t_{corr}(45; \alpha = 0,05) = 2,22$

$t_{corr}(45; \alpha = 0,01) = 2,90$

| Versuchstag | Vergleich | t | p* |
|---|---|---|---|
| 42 | 0 - 1 | 1,95 | - |
| | 0 - 2 | 0,62 | - |
| | 0 - 3 | 1,58 | - |
| | 0 - 4 | 4,62 | <0,01 |
| 91. | 0 - 1 | 2,53 | <0,05 |
| | 0 - 2 | 2,78 | <0,05 |
| | 0 - 3 | 2,64 | <0,05 |
| | 0 - 4 | 5,76 | <0,01 |
| 140. | 0 - 1 | 2,41 | <0,05 |
| | 0 - 2 | 1,18 | - |
| | 0 - 3 | 0,45 | - |
| | 0 - 4 | 3,39 | <0,01 |

Tab. 14 : Prozentuale Abweichungen der behandelten Gruppen 1 - 4 von der Kontrollgruppe 0 (signifikante Unterschiede sind unterstrichen)

| | Gruppe | | | |
|---|---|---|---|---|
| Tag | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | -6,6 | -2,7 | -3,7 | - 4,1 |
| 42 | -5,7 | -1,8 | -4,6 | -13,5 |
| 91 | -6,5 | -7,2 | -6,8 | -14,9 |
| 140 | -8,3 | -4,0 | -1,5 | -12,0 |

## 4.3 Linsenfrischgewichte

Die enucleierten Linsen der Tiere waren gleich nach der Präparation gepoolt und erst anschließend gewogen worden (vgl. 3.5.4). Die Meßdaten sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Das mittlere Linsenfrischgewicht wurde jeweils für jeden Pool errechnet. Daher standen für die statistische Auswertung nur 2 Werte pro Gruppe zur Verfügung.

Auf Abb. 6 findet sich eine graphische Darstellung der Linsenfrischgewichte mit Mittelwerten und Variationsbreiten. Es läßt sich erkennen, daß die Werte der Gruppen 3 und 4 etwas niedriger liegen als die Werte der 3 übrigen Gruppen. Eine einfache Varianzanalyse ergab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (vgl. Tab. 16), und auch DUNNETT's Test ergab für keine Versuchsgruppe einen signifikanten Unterschied zu den Werten der Kontrollgruppe.

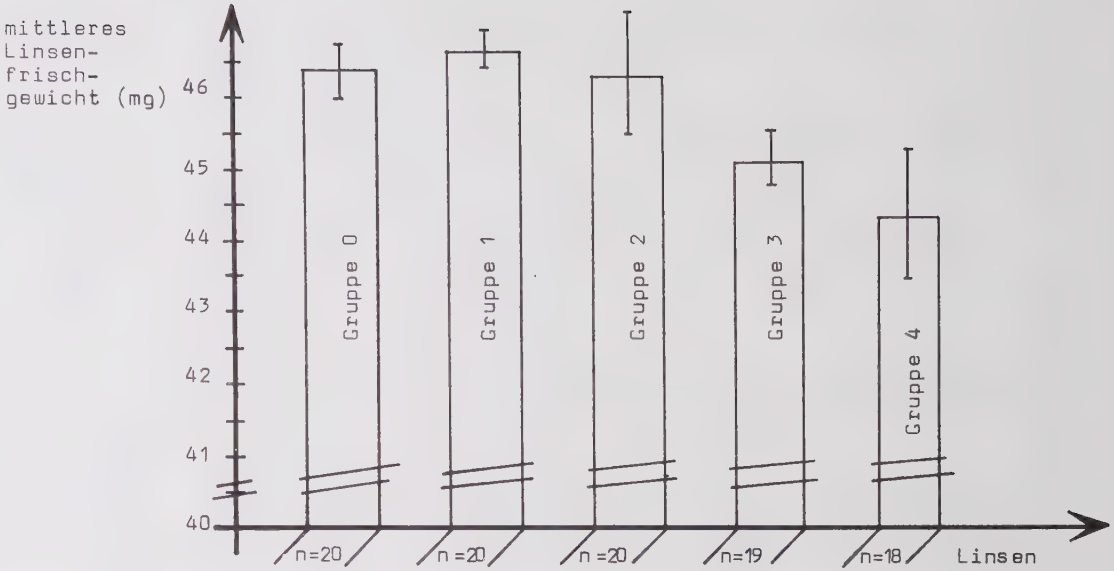



Abb. 6 : Mittlere Linsenfrischgewichte nach Versuchsabschluß.
(Mittelwerte und Variationsbreiten.)

Tab. 15 : Linsenfrischgewichte in den Versuchsgruppen. Es wurden jeweils alle rechten und alle linken Versuchsgruppen zu einem Homogenat gepoolt.

| Gruppe | Pool | | Frischgewichte der Pools | mittleres Frischgewicht |
|---|---|---|---|---|
| | Seite | n | mg | Linse |
| 0 | R | 10 | 466,5 | 46,7 |
| | L | 10 | 461,0 | 46,1 |
| 1 | R | 10 | 465,1 | 46,5 |
| | L | 10 | 469,6 | 47,0 |
| 2 | R | 10 | 471,8 | 47,2 |
| | L | 10 | 455,0 | 45,5 |
| 3 | R | 10 | 447,9 | 44,8 |
| | L | 9 | 410,0 | 45,6 |
| 4 | R | 8 | 346,8 | 43,4 |
| | L | 9 | 407,3 | 45,3 |

Tab. 16 : Statistische Auswertung der Linsenfrischgewichte in den Versuchsgruppen. Als Werte dienten hier nicht die Werte von Einzellinsen, sondern die aus dem Poolgewicht errechneten mittleren Linsenfrischgewichte aus allen rechten und allen linken Linsen.

A : Varianzanalyse

| V.U. | S.A.Q. | F.G. | M.A.Q. | F | p |
|---|---|---|---|---|---|
| zw. | 8,1286 | 4 | 2,0322 | 2,63 | - |
| inn. | 3,8592 | 5 | 0,7718 | | |
| total | 11,9878 | 9 | | | |

$F\ (4,5;\ \alpha = 0,05) = 5,19$

B : DUNNETT's - Test

| Vergleich | DUNNETT's t | p |
|---|---|---|
| 0 - 1 | 0,40 | - |
| 0 - 2 | 0,06 | - |
| 0 - 3 | 1,40 | - |
| 0 - 4 | 2,33 | - |

$t_{corr}$ (5; p = 4; $\alpha$ = 0,05) = 2,85

## 4.4 Rückstandsanalyse

Obwohl im Falle der Linsen durchschnittlich 440 mg Frischgewicht und im Falle der Hornhäute 100 mg Frischgewicht zu einem Homogenat gepoolt waren, konnte von keiner der drei Prüfsubstanzen Pentachlorphenol-, Trichlorphenol- und Chlorferron-Rückstände im Gewebe gefunden werden. Da die untere Nachweisgrenze der Methode bei 0,02 mg bis 0,04 mg Substanz in 100 ml Ansatz liegt, läßt sich also feststellen, daß - in Absolutmengen ausgedrückt - weniger als 0,8 µg Substanz in einem Linsenhomogenat und weniger als 0,7 µg Substanz in einem Hornhauthomogenat enthalten sein muß.

## 5 Diskussion

Es sollte mit dieser Arbeit festgestellt werden, ob die drei Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron Linsentrübungen erzeugen, wenn man sie im Langzeitversuch lokal appliziert.

Die Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron sind nach bestimmten Gesichtspunkten ausgewählt worden und stellen chlorierte, aromatische Modellsubstanzen mit persistenten Molekülgruppen dar. Damit ist eine Akkumulierung der Substanzen in der Linse möglich (HOCKWIN et al., 1972).

Ferner ist nachgewiesen worden, daß sich Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron auch unter den Inhibitoren der Atmungskettenphosphorylierung bzw. den Cholinesterasehemmern einordnen lassen (vgl. 2.2.1.4, 2.2.2.4, 2.2.3.4), aus deren Reihen bereits Stoffe mit eindeutig kataraktogener Wirkung hervorgegangen sind (vgl. 2.1).

Nicht zuletzt zeigen zwei der Substanzen, Trichlorphenol und Chlorferron, daß nicht nur Muttersubstanzen, sondern auch ihre Metaboliten Noxen darstellen können (vgl. 2.2.2.3, 2.2.3.3).

Entscheidend für die Auswahl der drei Substanzen waren aber die Ergebnisse von Untersuchungen mit Umweltchemikalien am Institut für Experimentelle Ophthalmologie in Bonn, durch die nachgewiesen werden konnte, daß die Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron bei örtlicher Anwendung am Auge tatsächlich in der Lage sind, bis in die Linse zu gelangen und dort an Enzymaktivitäten, Linseneiweiß und Substratkonzentrationen schwerwiegende Veränderungen hervorzurufen (vgl. 2.3).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen, schien es gerechtfertigt, nun in einem Langzeitversuch nachzuprüfen, ob die in vitro nachgewiesenen Schädigungsmöglichkeiten des Linsenstoffwechsels ausreichen, um in vivo sichtbare pathologische Linsenveränderungen im Sinne einer toxischen Katarakt zu erzeugen.

Die lokale Applikation bietet einige Vorteile. Bei systematischer Applikation könnte die Entstehung einer Katarakt wegen der Schädigung des Allgemeinstoffwechsels einem sekundären Einfluß der Umweltchemikalien zugeschrieben werden und nicht deren unmittelbaren, primären Einfluß auf die Linse selbst.

Aufgrund pharmakokinetischer Untersuchungen (vgl. 2.3) läßt sich die Konzentration der Umweltchemikalien am Wirkungsort Linse bei lokaler Applikation nach 30 und 60 Minuten im voraus genauer berechnen, als wenn man die Stoffe systematisch eingeben und damit den Imponderabilien der Resorption im Magen-Darmtrakt und der Blutkammerwasser-Schranke aussetzen würde.

Bei der vorliegenden Untersuchung konnten keine morphologischen Linsenveränderungen festgestellt werden, die auf eine Wirkung einer der drei Prüfsubstanzen zurückzuführen wären. Insbesondere können die in 4.1 beschriebenen Veränderungen an Tier 26 (Trichlorphenol-behandelt) und Tier 31 (Pentachlorphenol-behandelt) nicht dem Einfluß der Umweltchemikalien zugeschrieben werden. Es handelt sich hier in beiden Fälle um eine Cataracta complicata. Die Unbedenklichkeit der Substanzen im Hinblick auf die Entwicklung der Linsentrübungen bei Ratten bezieht sich naturgemäß auf die lokale Applikationsform.

Es wurden bereits mehrfach Versuche unternommen, mit anderen Hemmstoffen der Atmungskette bei lokaler Applikationsform eine Katarakt auszulösen.

Die Ergebnisse von MARTIN & CHRISTMANN (1972), denen es gelang, mit Disophenol nach lokaler Applikation an jungen Hunden reversible Katarakte zu erzeugen, stehen nicht im Gegensatz zu dem vorliegenden Versuchsergebnis mit den drei Umweltchemikalien 2,4,5-Trichlorphenol, Pentachlorphenol und Chlorferron, da er bei einmaliger Applikation eine höhere Dosis verwendete und damit weniger den akkumulativen, chronisch-toxischen Effekt prüfen wollte. Dasselbe gilt für GEHRING & BÜRGE (1969), denen es mit 2,4-Dinitrophenol als Pulver und 2,4-DNP in zwei verschiedenen Lösungsmitteln nach lokaler Applikation am Auge von Kaninchen ebenfalls gelang, reversible Katarakte zu erzeugen. Sicher konnte von Pentachlorphenol und

2,4-DNP nachgewiesen werden, daß sie Entkoppler der Atmungskettenphosphorylierung von gleicher Stärke sind (vgl. 2.2.1.4), aber andererseits kann Pentachlorphenol wegen seiner großen Zahl an Chlorsubstituenten nur zu einem geringen Prozentsatz in die Linse eindringen (vgl. 2.3). Das Ergebnis der morphologischen Untersuchung befindet sich auch in Übereinstimmung mit den Erfahrungen in der Anwendung der drei Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und der Muttersubstanz von Chlorferron als Pestizide. Obwohl eine Reihe von Vergiftungsfällen durch die untersuchten Stoffe vorlagen, konnten klinisch keine Veränderungen an der Linse beobachtet werden (vgl. 2.2.1.5.2, 2.2.2.5.2, 2.2.3.5.2) .

Auch in Tierversuchen mit diesen Umweltchemikalien sind nach der vorliegenden Literatur keine Linsenveränderungen aufgefallen, mit Ausnahme der Muttersubstanz von Chlorferron, Coumaphos (vgl. 2.2.3.5.2) .

Die Hornhäute erwiesen sich in allen Gruppen als gestippt. Die Stippung war stärker bei den behandelten Gruppen als bei der Kontrolle, aber sie erwiesen sich etwa gleich in den Gruppen Lösungsmittel und Substanzen; deswegen handelt es sich eher um einen unspezifischen Effekt der Tropfbehandlung als um einen Substanzeffekt.

Die Ergebnisse des Verlaufs der Körpergewichte zwischen den Gruppen zeigen, daß bis zur 4. Versuchswoche keine größeren Schwankungen in der Zunahme der Gewichte zu verzeichnen waren (Abb. 5) .

Von da an nahmen die Körpergewichte in der nur mit dem Lösungsmittel behandelten Gruppe am wenigsten zu, während die durchschnittlichen Körpergewichte in den Gruppen mit Pentachlorphenol-, 2,4,5-Trichlorphenol- und Chlorferron-behandelten Gruppen sich auf ein mittleres Niveau unterhalb der durchschnittlichen Körpergewichte der Tiere in der Kontrollgruppe einstellten. Die Stagnation der Körpergewichte in den mit Umweltchemikalien behandelten Gruppen liegt in einem Bereich, der auch von SAVIC et al. (1968) während der Applikation von Trichloräthylen an Kaninchen beobachtet werden konnte.

Bei der Langzeitfütterung des Herbizids Amizol (BHUYAN et al., 1973) und der oralen Langzeitapplikation von DMSO (VOGIN et al., 1970) blieben die Gewichtszunahmen der behandelten Tiere ebenfalls hinter denen der Kontrolltiere zurück. Bei den mit Chlorferron behandelten Tieren kann der am 91. und 140. Versuchstag mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikante Befund nicht überraschen, da diese Substanz als Cholinesterasehemmer wirkt (vgl. 2.2.3.4) .

Von Pentachlorphenol und 2,4,5-Trichlorphenol ist bekannt, daß beide Stoffe als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung im Sinne von 2,4-DNP auf das Körpergewicht wirken können (vgl. 2.1) . Die klinischen Beobachtungen und experimentellen Befunde nach chronischen Vergiftungen mit Pentachlorphenol und 2,4,5-Trichlorphenol bestätigen dies (vgl. 2.2.1.5.1, 2.2.1.6, 2.2.2.5.1, 2.2.2.6) . Allerdings konnten diese Stoffe nur am 91. Versuchstag mit 5% Irrtumswahrscheinlichkeit einen statistisch abgesicherten Einfluß auf die Körpergewichte ausüben (vgl. 4.2.4) .

Die allein mit dem Lösungsmittel behandelten Tiere der Gruppe 4 zeigten überraschenderweise eine etwa doppelt so starke Reduktion der Gewichtszunahme (Tab.14) wie die mit Umweltchemikalien behandelten Tiere in den Gruppen 1 - 3 .

Der Einfluß der Lösungsmittelbehandlung konnte vom 41. Versuchstag ab mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% abgesichert werden. Es ist erstaunlich, daß bei den Tieren aus den Gruppen 1 - 3 eine geringere Reduktion der Gewichtszunahme stattfand als bei Gruppe 4 (nur Lösungsmittel-behandelt), da alle mit den Umweltchemikalien behandelten Tiere aus den Gruppen 1 - 3 auch zugleich das Lösungsmittel bekamen (vgl. 3.1.3). Eine ähnliche Problematik bezüglich der Lösungsmittel-Behandlung ist auch bei den Linsenfrischgewichten, die am Ende des Versuchs ermittelt worden sind, festzustellen. Das Durchschnittsgewicht für eine Linse lag in der Gruppe 4 (Lösungsmittel-behandelt) am tiefsten. Varianzanalyse und DUNNETT's-t-Teste ergaben allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Analytik der Rückstände mittels Gaschromatograph ergab, daß, wenn überhaupt, weniger als 0,8 µg (Nachweisgrenze) der

Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol oder Chlorferron in den Linsen nach 140 Tagen akkumuliert waren. Nach den Versuchen von ISMAIL et al. (1977) konnte bei 2,4,5-Trichlorphenol festgestellt werden, daß nach einer Stunde noch 0,003 % der applizierten Menge in der Linse zu finden waren (vgl. 2.3). Nimmt man an, daß sich der Rückstand von 2,4,5-Trichlorphenol nach einer Stunde nicht mehr verringerte, so wäre nach 80 Tropfen = 24 Tagen Behandlung die analysierbare Menge in der Linse akkumuliert gewesen. Zum Ergebnis der Rückstandsanalyse von Pentachlorphenol muß darauf verwiesen werden, daß dieser Stoff in Ratten und Mäusen metabolisiert werden kann (vgl. 2.2.1.6) . Die Tatsache, daß sich die Stoffe nicht in der Linse akkumulierten, läßt das Ergebnis der morphologischen Untersuchung verständlicher werden. Es bleiben die Bedenken gegen das Lösungsmittel, insbesondere auch deshalb, weil das einzige im Verlauf des Versuchs zu Tode gekommene Tier aus der nur mit dem Lösungsmittel behandelten Gruppe 4 stammte. Hier wäre zu prüfen, welcher der Einzelbestandteile (vgl. 3.1.2) für die negativen Einflüsse auf das Körpergewicht und Linsenfrischgewicht verantwortlich ist.

## 6 Zusammenfassung

Es war bekannt, daß die Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron in die Linse gelangen und in vitro dort Stoffwechselveränderungen hervorrufen können.

Es wurde daher in einem Langzeitversuch untersucht, ob die drei genannten Stoffe in vivo Linsentrübungen erzeugen, wenn man sie regelmäßig lokal ins Auge appliziert. Ergänzend konnte die Entwicklung der Körpergewichte und - nach Abschluß der Behandlung - das Linsenfrischgewicht beurteilt werden. Durch Rückstandsanalysen sollte untersucht werden, ob sich die Umweltchemikalien in der Linse akkumulieren. Anhand der morphologischen Befunde konnte nachgewiesen werden, daß keine der drei Umweltchemikalien Linsentrübungen verursachte. Die Gewichtszunahmerate der mit Umweltchemikalien behandelten Tiere war erniedrigt. Die mit dem Lösungsmittel behandelten Tiere blieben am stärksten mit der Entwicklung des Körpergewichts zurück. Das durchschnittliche Linsenfrischgewicht war ebenfalls bei den Lösungsmittel-behandelten Tieren am stärksten erniedrigt. Ein Tier der Lösungsmittel-behandelten Gruppe ging gegen Ende des 140-tägigen Versuchs ad exitum. Bei einer unteren Nachweisgrenze von 0,02 mg/100 ml Lösung konnten nach Versuchsende keine Rückstände der drei Umweltchemikalien Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron in den Linsen festgestellt werden.

## 7 Literatur

AHLBORG, U.G., LINDGREN, J.E., MERCIER, M.: Metabolism of pentachlorophenol. Arch. Toxicol. 32, 271-281 (1974)

ALDRIDGE, W.N., REINER, E. : Acetylcholinesterase, two types of inhibition by an organophosphorus compound: One the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibitio by substrate. Biochem. J. 115, 147-162 (1969)

ANDERSON, G.W., ARNDT, C.H., GODBEY, E.G., JONES, J.C.: Cattle-feeding trials with derivatives of 2,4,5-Trichlorophenol. J.A.V.M.A. (Chicago) 115, 121-123 (1949)

ANONYMUS : Über 2,4,5-Trichlorphenol und TCDD. Naturwiss. 63, 477 (1976)

ANONYMUS : Rätselhafter Tod eines Kindes. Trierischer Volksfreun 236, 8 (1977)

AXELSON, V.: Miotic-induced cataract. Aus: The human lens in relation to cataract. 19, 249-263 (1973)

BAADER, E.W., BAUER, H.J.: Industrial intoxication due to Pentachlorophenol. Industrial Med. Surg. 20, 286-290 (1951)

BAUER, H., SCHULZ, K.H., SPIEGELBERG, V.: Berufliche Vergiftungen bei der Herstellung von Chlorphenolverbindungen. Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg. 18, 538-555 (1961)

BEILSTEIN: Handbuch der organischen Chemie. 3. u. 4. Ergänzungswerk Bd. 18/1, 343 (1975)

BERGNER, H., CONSTANTINIDIS, P., MARTIN, J.H.: Industrial Pentachlorophenolpoisoning in Winnipeg. Can. Med. Ass. J. 92, 448-451 (1965)

BETTMANN, J.W. : Experimental Dinitrophenol cataract. Amer. J. Ophthal. 29, 1388-1395 (1946)

BEVENUE, A., BECKMANN, H.: Pentachlorophenol: A discussion of its properties and its occurrence as a residue in human and animal tissues. Residue Reviews, 19, 83-134 (1967)

BHUYAN, K.C., BHUYAN, D.K., KATZIN, H.M.: Amizol-induced cataract and inhibition of lens catalase in rabbits. Ophthal. Res. 5, 236-247 (1973)

BRAUN, W.H., SAUERHOFF, M.W.: The pharmacokinetic profile of pentachlorophenol in monkeys. Toxicol. Appl. Pharmacol. 38, 525-534, (1976)

CAMPBELL, A.M.G. : Neurological complications associated with with insecticides and fungicides. Brit. Med. J. 23, 415-417, (1952)

CHADWICK, R.W., FREAL, J.: Comparative acceleration of Lindan metabolism to Chlorophenols by pretreatment of rats with Lindan or with DDT and Lindan. Fd. Cosmet. Toxicol. 10, 789-795 (1972)

COLLISTER, D.D., LOCKWOOD, D.T., ROWE, V.K.: Toxicologic information on 2,4,5-Trichlorophenol. Toxicol. Appl. Pharmacol. 3, 63-70 (1961)

DEICHMANN, W.M.: The toxicity of chlorophenols for rats. Fed. Proc. 2, 76-77 (1943)

DEICHMANN, W.M., MERGARD, E.G.: Comparative evaluation of methods employed to express the degree of toxicity of a compound. J. Indust. Hyg. Toxicol. 30, 373-378 (1948)

DEICHMANN, W.M., MACHLE, W., KITZMILLER, K.V., THOMAS, G.: Acute and chronic effects of pentachlorophenol and sodium pentachlorophenate upon experimental animals. J. Pharmacol. Exp. Ther. 76, 104-117 (1942)

DIAMANT, H.: Cataract due to cholinesterase inhibition in the guinea-pig. Acta Ophthal. 32, 257-261 (1954)

DITTMER, D.: Handbook of Toxicology. Vol.V. Fungizides. S.130-131, Philadelphia + London (1959)

DUNNET, C.W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. statist. Assoc. 50, 1096-1121 (1955)

DUNNET, C.W.: New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491 (1964)

FIELD, J., TAINTER, E.G., MARTIN, A.W., BELDING, H.S.: Studies on the oxygen consumption of the rabbit lens and the effect of 2,4,-Dinitrophenol thereon. Amer. J. Ophthal. 20, 779-794 (1937)

FITZGERALD, C.H., CLAUD, L.B., BECK, E.G.: Degradation of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid in woody plants. Plant Physiol. 42, 459-460 (1967)

FORTH, W.: Das Unglück von Seveso. Deutsch. Ärztebl. 44, 2617-2626 (1977)

GALLMEIER, W., SCHULTEN, K.: Jahresbericht der Gewerbeaufsicht des Landes NRW. S.278 (1975)

GEHRING, P.J., BUERGE, J.F.: The cataractogenic activity of 2,4-Dinitrophenol in ducks and rabbits. Toxicol. Appl. Pharmacol. 14, 475-486 (1969)

GOLDMANN, T.J.: Schwerste akute Chlorakne durch Trichlorphenolzersetzungsprodukte. Arbeitsmed., sozialmed., Arbeitshyg. 1, 12-18 (1972)

GORDON, D.: How dangerous is Pentachlorophenol? The Med.J.of Australia 43, 485-488 (1956)

GROVER, P.L., SIMS, P.: Conjugations with Glutathione. Biochem. J. 95, 156-160 (1965)

GRUNOW, W., BÖHME, Chr.: Über den Stoffwechsel von 2,4,5-T. und 2,4-D. bei Ratten und Mäusen. Arch. Toxicol. 32, 217-225 (1974)

HADDAD, H.M.: Lens organ culture. In: J.G. BELLOWS: Cataract and abnormalities of the lens. S.59-67. Grune + Stratton, New York (1975)

HAY, A.: Toxic cloud over Seveso. Nature 262, 636-638 (1976)

HERDT, J.R., LOOMIS, L.N., NOLAN, M.O.: Effect on calves of prolonged oral administration of three potential molluscacides. Public Health Reports 66 II, 1313-1317 (1951)

HOCKWIN, O.: Persönliche Mitteilungen (1977)

HOCKWIN, O., OKAMOTO, T., LICHT, W., NOLL, E.: Effect of pilocarpine on lens metabolism. Ophthalmologica 152, 46-56 (1966)

HOCKWIN, O., KLEIN, W., KORTE, I.: Beiträge zur ökologischen Chemie L III. Veränderungen der Enzymaktivitäten der Linse des Auges durch Umweltchemikalien. Chemosph. 6, 261-266 (1972)

HORNER, W.D.: Cataract following dinitrophenol treatment for obesity. Arch. Ophthal. 16, 447-461 (1936)

HORNER, W.D.: Dinitrophenol and its relation to the formation of cataract. Arch. Ophthal. 27, 1097-1121 (1942)

IMAIZUMI, K., ATSUMI, K., TANIFUJI, Y., ISHIKAWA, Y., HOSHI, H.: Clinical observations of ophthalmic disturbances due to agricultural chemicals. Folia Ophthal. Jap. 22, 154-156 (1971)

ISMAIL, R.M., KORTE, I., HOCKWIN, O., KLEIN, W.: Permeability of the isolated bovine lens capsule for environmental chemicals. Exp. Eye Res. 20, 179 (1975)

ISMAIL, R.M., BOURS, J., KORTE, I., HOCKWIN, O., KLEIN, W.: The effect of polychlorophenols on the content of protein fraction as well as on enzyme activities and substrate concentrations of bovine lenses in vitro. Exp. Eye Res. 24, 100 (1977 a)

ISMAIL, R.M., SALMINEN, L., KLEIN, W.: Distribution of topically applied environmental chemicals in the rabbit eye. Chemosphere im Druck (1977 b)

JENSEN, N.E., SNEDDON, I.B., WALKER, A.E.: Tetrachlorobenzodioxin and chlorakne. Trans. St. John's Hosp. Derm. Soc. (London) 58, 172-177 (1972)

JOHNSON, R.L., GEHRING, P.J., KOCIBA, R.J., SCHWETZ, B.A.: Chlorinated dibenzodioxins and pentachlorophenol. Environ. Health Perspect. 5, 171-175 (1973)

KANE, P.F., COHEN, C.J., BETKER, W.R., MAC DOUGALL, D.: Assay of Co-Ral in technical material and formulated products. J. Agr. Food Chem. 8, 26-29 (1960)

KAUFMAN, P.L., AXELSON, V., BARANY, E.H.: Induction of subcapsular cataracts in cynomolgus monkeys by Echthiophate.Arch. Ophthalmol. (Chicago) 95, 499-509 (1977)

KEHOE, R.A., DEICHMANN-GRUEBLER, W.M., KITZMILLER, K.V.: Toxic effects upon rabbits of pentachlorophenol and sodiumpentachlorophenate. J. Ind. Hyg. Toxicol. 21, 160-172 (1939)

KIMMIG, J., SCHULZ, K.H.: Chlorierte aromatische zyklische Äther als Ursache der sogenannten Chlorakne. Naturwiss. 44, 337-338 (1957)

KLEEBERGER, K.E., GORDON, D.M.: Die Wirkung von Dimethylsulphoxid (DMSO) auf Tier-und Menschenaugen. Fortschr. Med. 85, 171-174 (1967)

KLEIFELD, O, HOCKWIN, O.: Die Wirkung von Dinitrophenol, Äthylendiamintetraessigsäure, Diamox und Butazolidin auf Stoffwechselabläufe der Linse. Graefes Arch. Ophthal. 158, 54-63 (1956)

KLEU, G., GÖLTZ, R.: Spät-und Dauerschäden nach chronisch-gewerblicher Einwirkung von Chlorphenolverbindungen. Med.Klin. 66, 53-58 (1971)

KNUDLSEN, I., VERSCHUUREN, H.G., TONKELAAR, E.M., KROES, R., HELLEMANN, F.: Short-term toxicity of pentachlorophenol in rats. Toxicology 2, 141-152 (1974)

KORTE, I., ISMAIL, R.M., HOCKWIN, O., KLEIN, W.: Studies on the influences of some environmental chemicals and their metabolites on the content of free adenine nucleotides, intermediates of glycolysis and on the activities of certain enzymes of bovine lenses in vitro. Chemosph. 2, 131-136 (1976)

KOTZLOWA, T.F., SHAKHOVA, G.B., BELUGIN, V.F.: Production of the insecticide preparation. Co-Ral.Khim.Prom.(Moscow) 47, 429 - 430 (1971)

KREIBIG, W.: Zur operativen Behandlung des akuten Glaukomanfalles. Klin. Mbl. Augenheilk. 125, 39-44 (1954)

LARSEN, R.V., KIRSCH, L.E., SHAW, S.M., CHRISTIAN, J.E., BORN, G.S.: Excretion and tissue distribution of uniformly labeled $C^{14}$- Pentachlorophenol in rats. Pharm. sci. 61, 2004-2006 (1972)

LEE, R.M.: Di-(2 Chloroethyl)Aryl Phosphates. Biochem. Pharmacol. 13,1551-1568 (1964)

LE ROY BJERKE, E., HERMANN, J.L., MILLER, P.W., WETTERS, J.H.: Residue study of phenoxy herbicides in milk and cream. J. Agr. Food Chem. 20 No.5, 963-967 (1972)

LOOMIS, W.F.: Experiments on the mechanism of coupling between respiration on phosphorylation. Fed. Proc. 8, 220 (1949)

MAHLEN, S.: Zur Kenntnis der Katarakta bei Dinitrokresolbehandlung. Acta Ophthal. 16, 563-572 (1938)

MARTIN, C.L., CHRISTMAS, R., LEIPOLD, H.W.: Formation of temporary cataracts in dogs given a disophenol preparation. J.A.V.M.A. 161(3), 294-300 (1972)

MATSUNAKA, S., KUWATSUKA, S.: Environmental problems related to herbicidal use in Japan. Environ. Qual. Saf. 4, 149-159 (1975)

MAY, G.: Chlorakne from the accidental production of tetrachlorodibenzodioxin. Brit. J. Indust. Med. 30, 276-283 (1973)

MELNIKOW, N.N.: Chemistry of pesticides. Residue Reviews, 36, 48-49, 102-104, 332-334 (1971)

MENON, J.A.: Tropical hazards associated with the use of pentachlorophenol. Brit. Med. J. 1, 1153-1154 (1958)

MESTER, V., STEIN, H.J., KOCH, H.R.: Experimental lens opacities in rabbits induced by intraocular application of acetylcholine. Ophthalmic. Res. 9, 99-105 (1977)

MICHON, J., KINOSHITA, J.H.: Cholinesterase in the lens. Arch. Ophthal. 77, 804-808 (1967)

MONROE, R.E., ROBBINS, W.E.: Studies on the mode of action of synergized Bayer 21/299 and its corresponding phosphate in the house fly. J. Econ. Entomol. 52, 643-647 (1959)

MÜLLER, H.K., HOCKWIN, O., KLEIFELD, O, DARDENNE, U.: Der Einfluß von Pilocarpin und Mintacol auf den Stoffwechsel der Linse. Ber. dsch. ophthal. Ges. 60, 115-120 (1956)

NOMURA, S.: Studies of chlorophenol poisoning. Rep. 1 A clinical examination of workers exposed to pentachlorophenol. Bull. Hyg. 29, 294 (1954)

OGINO, S., YASUKARA, K.: Biochemical studies on cataract. Production of cataracts in guinea pigs with dinitrophenol. Am. J. Ophthal. 43, 936-946 (1957)

PARKER, V.H.: Effect of nitrophenols and halogenphenols on the enzymic activity of rat-liver mitochondria. Biochem. J. 69, 306-311 (1958)

PESTICIDE DICTIONARY 74 : Meister publishing company, Wiloughby, Ohio, D 75, D 101, D 199 (1974)

PICKERING, W.R., MALONE, J.C.: The acute toxicity of dichloroalkylarylphosphates in relation to chemical structure. Biochem. Pharmacol. 16, 1183-1194 (1967)

PIETSCH, R.L., BOBOC, B., FINKLEA, J.F., VALLOTTEN, W.W.: Lens opacities and organophosphate cholinesterase-inhibiting agents. Am. J. Ophthal. 73 (2), 236-242 (1972)

PLAPP, F.W., CASIDA, J.E.: Bovine metabolism of organophosphorus insectizides. Metabolic fate of O,O-Dimethyl-O-(2,4,5-Trichlorphenyl)-Phosphorothioate in rats and a cow. J. Agr. Food Chem. Vol.6 Nr.9, 662-666 (1958)

ROBBINS, B.H.: Dinitrophenol cataract. Production in an experimental animal. J. Pharmacol. 80, 264-271 (1944)

RÖMPP, H.: Chemielexikon. S. 6634, Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart (1966)

RUBIN, L.F., MATTIS, P.A. : Dimethylsulfoxide: Lens changes in dogs during oral administration. Science 153, 83-84 (1966)

SANDERMANN, W.: Polychlorierte aromatische Verbindungen als Umweltgifte. Naturwiss. 61, 207-213 (1974)

SANDERS, R.: Das Gift von Seveso wirkt weiter. Die Zeit, Nr.11, 65-66 (1976)

SAVIČ, S., BAASKE, H., HOCKWIN, O.: Biochemische Veränderungen am Kaninchenauge bei Vergiftungen mit Trichloräthylen. Graefes Arch. Ophthal. 175, 1-6 (1968)

SCHWETZ, B.A., KEELER, P.A., GEHRING, P.J.: The effect of purified and commercial grade pentachlorophenol on rat embryonal and fetal development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 28, 151-161 (1974)

SMITH, E.R., MASON, M.M., EPSTEIN, E.: The ocular effects of repeated dermal applications of dimethylsulfoxide to dogs and monkeys. J. Pharmacol. exp. Ther. 170, 364-370 (1969)

TAINTER, M.L., BORLEY, W.P.: Influence of vitamins and dinitrophenol on the production of experimental cataract. Arch. Ophth. 20, 30-36 (1938)

TAMURA, O, MITSUI, Y.: Organophosphorous pesticides as a cause of myopia in school children: An epidemiological study. Jap. J. Ophthal. 19, 250-253 (1975)

TRUHAUT, R., VITTE, G., BOUSSEMART, E.: Recherches sur la toxicologie du pentachlorophénol. Arch. maladies profess. 13, 561-569 (1952)

ULLMANN: Enzyklopädie der techn. Chemie. Bd.5, 496-497 (1954)

VAHRENHOLT, F.: Seveso, eine beispiellose Umweltkatastrophe. Umwelt 1, 59-64 (1977)

VICKERY, D.S., ARTHUR, B.W.: Animal systemic activity, metabolism, and stability of Co-ral (Bayer 21/199). J. Econ. Entomol. 53, 1037-1043 (1960)

VINOGRADOVA, V.K., KALYAGANOV, P.I., SUDONIA, L.T., ELIZAROV, G.P.: Hygienic characteristics of working conditions and health status of workers engaged in the production of sodium pentachlorophenate. Gig.Tr.Prof.Zabol. 17(8), 11-13 (1973)

VOGIN, E.E., CARSON, S., CANNON, G.: Chronic toxicity of DMSO in primates. Toxicol. Appl. Pharmacol. 16, 606-612 (1970)

WALLMANN, H.F.: Dinitrophenol Cataract. Am. J. Ophthal. 19, 885-888 (1936)

WEINBACH, E.C.: The effect of pentachlorophenol on oxydative phosphorylation. J. Biol. Chem. 210, 545-550 (1954)

WEINBACH, E.C.: The influence of pentachlorophenol on oxidative and glycolytic phosphorylation in snail tissue. Arch. Biochem. Biophys. 64, 129-143 (1956)

WEINBACH, E.C.: Biochemical basis for the toxicity of pentachlorophenol. Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 393-397 (1957)

WEINBACH, E.C., GARBUS, J.: The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein. J.Biol. Chem. 240 No.4, 1811-1819 (1965)

WINER, B.J.: Statistical principles in experimental design. Mc Graw-Hill, London (1970)

WYLLIE, J.A., GABICA, J., BENSON, W.W., YODER, J.: Exposure and contamination of the air and employees of a pentachlorophenol plant, Idaho-1972. Pesticides Monitoring J. 9(3), 150-153 (1975)

YAMANE, T.: Statistik. Fischer-Taschenbuch (1976)

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Otto Hockwin danke ich für die Themenstellung und seine freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Hans Reinhard Koch danke ich herzlich für seine hilfreiche Unterstützung bei den Experimenten und bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 2. Juni 1950 wurde ich als Sohn der Eheleute Peter und Helene Boettel, geb. Mohn, in Trier geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule, landwirtschaftlicher Berufsausbildung, Besuch der landwirtschaftlichen Fachschule und des Staatlichen Koblenz-Kollegs legte ich in Koblenz am 26.6.1972 die Reifeprüfung ab.
Am 29.4.1973 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Medizinischen Hochschule Hannover. Hier legte ich nach zwei Semestern die naturwissenschaftliche und nach fünf Semestern die zahnärztliche Vorprüfung ab. Das klinische Studium nahm ich im Wintersemester 1975/76 an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn auf. Dort bestand ich am 15. Januar 1979 vor dem Prüfungsausschuß in Bonn die zahnärztliche Prüfung.